

Amarilis Scremin Paulino

**CRISTAIS OCOS COMO ESTRATÉGIA PARA
INCREMENTAR A VELOCIDADE DE
DISSOLUÇÃO DE FÁRMACOS POUCO SOLÚVEIS**

Tese de doutorado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Farmácia da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do Grau
de Doutor em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Simone
Gonçalves Cardoso

Co-orientadora: Profa. Dra. Silvia L.
Cuffini

Florianópolis
2013

Este trabalho é dedicado a minha
amada família.

AGRADECIMENTOS

O melhor agradecimento que existe é sentir verdadeiramente gratidão, é agradecer a cada minuto a Deus e a todas as pessoas que pouco ou intensamente participaram de nossa caminhada. Agradecer é expressar sentimentos, mas nunca conseguimos transformar toda esta gratidão em palavras.

Neste momento de agradecimento penso primeiramente em Deus, que me iluminou neste caminho, e nos meus pais, que me desejaram, amaram e sempre me incentivaram a realizar meus sonhos. Penso no meu primeiro dia de aula na escola e agradeço imensamente todos os professores que contribuíram em todas estas etapas até o doutorado.

Penso na minha família (Niraldo, Amabile e Angelo) que sempre foram um apoio incondicional. Obrigada e espero continuar retribuindo sempre com muito amor e gratidão. Família, o que seria de mim sem eles? Sempre estiveram comigo em todos os momentos. Obrigada as minhas irmãs, irmão, cunhados, cunhada e sobrinhos.

Simone e Silvia. O que dizer? Orientadoras, família, amiga. Deus sempre colocou pessoas boas no meu caminho, mas vocês foram especiais demais. Agradeço todos os dias por tê-las conhecido e sempre desejo a vocês o que podemos ter de melhor: saúde, felicidade, amor e muito sucesso. Obrigada por tudo. Amo vocês!

Aos meus amigos do laboratório: adoro vocês! Aqueles que já passaram pelo laboratório e seguiram seus caminhos, os que ainda permanecem lá trabalhando e os que estão chegando o que devo dizer é maior que um muito obrigado, não existe palavras que possam expressar este sentimento. Vou levar vocês onde estiver no meu coração e sempre desejar tudo de bom e que tenham um caminho de muito sucesso.

Também quero agradecer as pessoas que me acolheram na Espanha, foram muito especiais.

Obrigada a todos os órgãos e instituições que contribuíram financeira ou logisticamente para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada a todos que direta ou indiretamente participaram desta longa caminhada.

Deixo pra todos vocês este pensamento do Fernando Pessoa: “O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

“Para ser grande, ser inteiro; nada teu exagera ou exclui; ser todo em cada coisa; põe quanto és no mínimo que fazes; assim em cada lago, a lua toda brilha porque alta vive.”

(Fernando Pessoa)

RESUMO

Fármacos pouco solúveis apresentam limitações na biodisponibilidade devido à baixa solubilidade e velocidade de dissolução. A modificação do hábito cristalino, utilizando diferentes técnicas de cristalização, tem sido empregada como estratégia para melhorar a velocidade de dissolução deste grupo de fármacos. O deflazacorte (DFZ) e a carbamazepina (CBZ) são fármacos que possuem baixa solubilidade em água. O método de cristalização por antissolvente, empregando diferentes condições, foi utilizado na cristalização do DFZ e CBZ, com o objetivo de obter cristais com hábitos modificados, realizar a caracterização e avaliar a influência da morfologia na velocidade de dissolução. A caracterização dos cristais obtidos foi realizada através da microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura (SEM), difração de raios X (XRPD), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier (DRIFT). O método do antissolvente possibilitou a obtenção de cristais ocos para ambos os fármacos estudados. Existem poucos relatos de cristais ocos para fármacos, sendo que para nenhum destes relatos foi utilizado o método do antissolvente. Os cristais ocos de DFZ apresentaram a mesma estrutura cristalina que a matéria-prima inicial; no entanto, para a CBZ, além da formação dos cristais ocos, houve transformação polimórfica da forma III (matéria-prima inicial) para a forma I (cristais ocos). A quantificação da dissolução foi realizada por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectroscopia no ultravioleta (UV). Os cristais ocos proporcionaram um aumento significativo no perfil e eficiência de dissolução quando comparados às demais formas cristalinas do DFZ e da CBZ. Foram realizados estudos com os cristais ocos do DFZ com o objetivo de elucidar o mecanismo formação dos mesmos, assim como avaliar a influência deste hábito na estabilidade e no efeito anti-inflamatório do fármaco. Os estudos do mecanismo de crescimento demonstraram que a formação do cristal oco está relacionada ao efeito Berg. Fatores como a quantidade de água e evaporação do solvente interferem diretamente na força impulsora, modificando a velocidade de crescimento, que é importante para a formação do cristal oco. Ensaios *in vivo* realizados com os cristais ocos de DFZ indicaram um maior efeito anti-inflamatório quando comparado com as demais formas cristalinas. Os cristais ocos foram estáveis por 6 meses a 40 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ Umidade Relativa, mas apresentaram sensibilidade à luz, quando irradiados sob luz UV 254 nm (1,2 milhões de Lux/hora). A caracterização do cristal irradiado indicou diminuição

do ponto de fusão; desaparecimento da banda de máxima absorção no UV e de banda correspondente ao grupamento OH no infravermelho; no entanto, ambos apresentaram a mesma massa e os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênios foram sobreponíveis, sugerindo que não houve alteração no esqueleto esteroidal. Os cristais ocos irradiado mostraram maior citotoxicidade e menor efeito anti-inflamatório *in vitro*. Os cristais ocos de DFZ permitiram um aumento na velocidade de dissolução e uma melhor atividade anti-inflamatória quando comparado às outras formas cristalinas do fármaco, mas apresentaram uma menor estabilidade à luz, devendo ser protegido deste fator durante armazenamento e uso.

Palavras chave: Deflazacorte. Cristais ocos. Mecanismo de crescimento. Dissolução. Hábito cristalino. Estabilidade.

ABSTRACT

Poorly soluble drugs have limited bioavailability due to their low solubility and dissolution rate. The modification of the crystal habit using different crystallization techniques has been employed as a strategy for improving the dissolution rate of this type of drug. Deflazacort (DFZ) and carbamazepine (CBZ) have low solubility in water. The antisolvent crystallization method, employing different conditions, was used in the crystallization of DFZ and CBZ, with the aim of obtaining crystals with modified habits, to characterize them and to evaluate the influence of the morphology on the dissolution rate. The characterization of the crystals obtained was carried out by optical microscopy, scanning electron microscopy (SEM), X-ray powder diffraction (XRD), differential scanning calorimetry (DSC) and diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) spectroscopy. The antisolvent method enabled the obtainment of hollow crystals for both drugs studied. There are few reports on the hollow crystal form of drugs and the antisolvent method was not used in any of these previous studies. Hollow crystals of DFZ have the same crystal structure as the initial raw material; however, for CBZ, besides the formation of hollow crystals there was a polymorphic transformation from form III (initial raw material) to form I (hollow crystals). The quantification of the dissolution was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC) and ultraviolet (UV) spectroscopy. The hollow crystals provided a significant increase in the dissolution profile and efficiency compared with the other crystalline forms of DFZ and CBZ. Studies were carried out with hollow crystals of DFZ in order to elucidate the mechanism associated with their formation, as well as to evaluate the influence of this habit on the stability and on the anti-inflammatory effect of the drug. Studies on the growth mechanism demonstrated that the formation of hollow crystals is related to the Berg effect. Factors such as the quantity of water and evaporation of the solvent interfere directly with the driving force, modifying the growth rate, which is important for the formation of hollow crystals. *In vivo* tests carried out with hollow crystals of DFZ indicated a greater anti-inflammatory effect when compared with other crystallized forms. The hollow crystals were stable for 6 months at $40 \pm 2^\circ\text{C}/75 \pm 5\%$ relative humidity, but showed light sensitivity when irradiated under UV 254 nm light (1.2 million lux/h). The characterization of the irradiated crystals indicated a reduction in the melt point and the disappearance of the maximum absorption band in the UV region and of the band corresponding to the

OH group in the infrared region; however, they presented the same mass and the proton nuclear magnetic resonance spectra were overlapping, suggesting that there was no alteration in the steroid skeleton. The irradiated hollow crystals showed greater cytotoxicity and an inferior anti-inflammatory effect *in vitro*. The hollow crystals of DFZ permitted an increase in the dissolution rate and an improvement in the anti-inflammatory activity compared with the other crystalline forms of the drug, but they had reduced stability in the presence of light and need to be protected from light during storage and use.

Keywords: Deflazacort. Hollow crystals. Growth mechanism. Dissolution. Crystalline habit. Stability.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Table 1: Thermal analyses of CBZ-RM, CBZ-C, DFZ-RM and DFZ-C samples..... 71

Table 2: Average of efficiency dissolution of raw materials and hollow crystals of CBZ and DFZ with a confidence interval of 95%. 75

CAPÍTULO 3

Table 1: Percentage of crystallized mass obtained by antisolvent crystallization at time 4 and 60 minutes, without stirring. 93

Table 2: Mean values and standard deviation for the particle size distributions, density and surface area 96

Table 3: Results for IDR of raw materials and crystallized sample in pure water or 0.05% SDS..... 97

Table 4: Average dissolution efficiency of RM1, RM2 and R4 in water or water containing 0.05% SDS, with a confidence interval of 95%. . 100

CAPÍTULO 5

Tabela 1: Experimental values obtained for the determination of Deflazacort (DFZ) after exposition to UV radiation and temperature/humidity. 146

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1

| | |
|--|----|
| Figura 1: Curva de solubilidade hipotética adaptada de Davey & Garside (DAVEY; GARSIDE, 2002)..... | 38 |
| Figura 2: Figura ilustrativa da evolução morfológica da velocidade de crescimento versus força impulsora ($\Delta\mu/(kBT)$). Curva (a) corresponde ao crescimento em espiral, curva (b) 2DNG e curva (c) mecanismo de crescimento tipo adesivo. Dois pontos críticos de força impulsora $\Delta\mu/(kBT^*)$ e $\Delta\mu/(kBT^{**})$ são mostrados e são indicadas as regiões onde o crescimento poliédrico, funil, dendrítico, esferulita e fractal são esperados. Adaptado de Sunagava (SUNAGAWA, 2010)..... | 42 |
| Figura 3: Modelo esquemático da evolução morfológica com o aumento da força impulsora; (a) forma poliédrica, produzida por cinética controlada, com um sistema próximo ao equilíbrio; morfologia formato de funil, devido efeito Berg; (C) dendrito ordenado com simetria cristalográfica; (d) dendrito parcialmente desordenado com um tronco monocristalino ordenados e ramos laterais desordenados policristalino; dendritos policristalinos desordenados como ocorre na agregação por difusão limitada; e (f) morfologia de ramificação densa (OAKI; IMAI, 2003). | 42 |
| Figura 4: Estrutura química do Deflazacorte (SWEETMAN, 2007). ... | 54 |
| Figura 5: Estrutura química da carbamazepina (“Farmacopeia Brasileira,” 2010). | 55 |

CAPÍTULO 2

| | |
|--|----|
| Figure 1: Scanning Electron Microscopic Photographs of crystallized sample of CBZ. | 68 |
| Figure 2: Scanning Electron Microscopic Photographs of crystallized sample of DFZ. (The channels are indicated by an arrow). | 69 |
| Figure 3: X-Ray Diffraction of CBZ-RM (A); CBZ-C (B); DFZ-RM (C); DFZ-C (D). | 70 |
| Figure 4: Differential Scanning Calorimetry (DSC) of CBZ-RM (A); CBZ-C (B); DFZ-RM (C); DFZ-C (D) in dynamic nitrogen atmosphere (50 mL min ⁻¹) and heating rate of 10 °C min ⁻¹ | 71 |
| Figure 5: Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transformed Spectroscopy of CBZ-RM (A) ; CBZ-C (B); DFZ-RM (C); DFZ-C (D). | 72 |
| Figure 6: Dissolution profile of raw material and hollow crystal: CBZ (A); DFZ (B). | 74 |

CAPITULO 3

| | |
|--|----|
| Figure 1: Scanning electron micrographs of tubular crystals of DFZ crystallized with methanol:water (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 and 1:6), after 4 minutes, without stirring | 91 |
| Figure 2: Scanning electron micrographs of tubular crystals of DFZ crystallized by methanol:water (1:3), after 4 minutes, without stirring. | 92 |
| Figure 3: Scanning electron micrographs of tubular crystals of DFZ crystallized by methanol:water (1:1, 1:3 and 1:6), without stirring (A, B, C), with magnetic stirring (D, E, F) and with sonication (G, H, I) for 4 min. | 93 |
| Figure 4: (A) Chemical structure of deflazacort; (B) X-Ray Diffraction; (C) Differential Scanning Calorimetry; (D) Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform spectroscopy of RM1..... | 94 |
| Figure 5: Scanning Electron micrographs of DFZ raw materials (RM1, RM2) and hollow tubular crystals (R4). | 95 |
| Figure 6: Intrinsic dissolution curves for RM1, RM2 and R4 (A) in dissolution medium containing water and (B) in water containing 0.05% sodium lauryl sulfate (SDS). Each point represents mean \pm SEM (n=3). | 97 |
| Figure 7: Dissolution profiles for RM1, RM2 and R4: (A) in water; (B) in water with 0.05% SDS. Each point represents mean \pm SEM (n=3).. | 98 |
| Figure 8: Dissolution profiles for RM1, RM2 and R4 in water or water containing 0.05%, 0.5% and 1% of SDS. Each point represents mean \pm SEM (n=3). | 99 |

CAPÍTULO 4

| | |
|---|-----|
| Figure 1: Scanning electron micrographs of tubular crystals of DFZ crystallized by DFZ-MeOH (25 mg/mL):water (1:½): (A) Solid starting crystal growth; (B) and (C) the onset of hollow crystal by Berg Effect; (D), (E) and (F) inside of the crystal; (G), (H) and (I) hollow features in the (100) face. | 116 |
| Figure 2: Schematic illustration of the morphological evolution of a crystal on a normal growth rate R versus driving force $\Delta\mu/(kBT)$ diagram. Curve (a) corresponds to spiral growth mechanism, curve (b) to 2DNG, and curve (c) to adhesive-type growth mechanism. Two critical driving forces $\Delta\mu/(kBT^*)$ and $\Delta\mu/(kBT^{**})$ are shown for one crystallographic face, and the regions where polyhedral, skeletal, dendritic, spherulitic, and fractal morphologies are expected are indicated (SUNAGAWA, 2010). | 117 |

| | |
|---|-----|
| Figure 3: Step morphology of spiral hillocks of DFZ crystal by LCM-DIM..... | 117 |
| Figure 4: (A-F) Polarized light microscopy image of growth sequence of hollow crystal DFZ at the following conditions: DFZ-MeOH 25 mg/mL: water (1:½) in open crystallizer..... | 118 |
| Figure 5: (A) Crystal size, (B) Mean growth rate and (C) ratio a/b of hollow crystal obtained in open crystallizer; (D) Crystal size, (E) Mean growth rate and (F) ratio a/b of solid crystal obtained in closed crystallizer, by antisolvent crystallization of DFZ-MeOH 25 mg/mL:water (1:½). | 120 |
| Figure 6: Schematic illustration of the morphological evolution of a crystal on a mean growth rate (face 100) of DFZ versus time (driving force $\Delta\mu/(kBT)$ diagram on spiral growth. Two critical driving forces $\Delta\mu/(kBT^*)$ and $\Delta\mu/(kBT^{**})$ are shown, and the regions where polyhedral, hopper (Berg effect) and hollow morphologies were found are indicated. | 121 |
| Figure 7: DFZ Solubility of supersaturated solution using different proportions of methanol:water (1:0; 1: ½; 1:1; 1:2; 1:3)..... | 122 |
| Figure 8: Polarized light microscopy image of DFZ crystals obtained by antisolvent crystallization of DFZ-MeOH (25 mg/mL):water in the following proportion: (A) 1:½; (B) 1:1; (C) 1:2 and (D) 1:3 in open crystallizer. | 123 |
| Figure 9: Morfology of Deflazacort hollow crystal with the defining exposed crystal planes labeled. | 124 |
| Figure 10: Stereoview showing the molecular packing of plane (100) of DFZ hollow crystal..... | 125 |
| Figure 11: Polarized light microscopy image of DFZ crystals obtained by antisolvent crystallization of DFZ-MeOH (25 mg/mL):water (1:½) in closed crystallizer. | 126 |
| Figure 12: Polarized light microscopy image of DFZ crystals obtained by DFZ-MeOH crystallization. Closed glass vial: (A) 35 mg/mL; (B) 45 mg/mL; (C) 60 mg/mL. Open crystallizer: (D) 25 mg/mL; (E) 35 mg/mL; (F) 45 mg/mL; (G) 60 mg/mL. | 127 |

Capítulo 5

| | |
|--|-----|
| Figure 1: Chemical structure of Deflazacort | 138 |
| Figure 2: Effect of Deflazacort (DFZ) hollow crystal (R4), micronized (RM1) and crystalline (RM2) raw material (3 mg) in the paw oedema models induced by carageenan after 0 - 90 min to inflammatory induction. Each value represents the mean \pm S.E.M. of 6 animals, and | |

asterisks (*) indicate significant inhibition of the paw weight in relation to the corresponding untreated groups (C), $P < 0.05$ 145

Figure 3: Effect of Deflazacort (DFZ) hollow crystal (R4), micronized (RM1) and crystalline (RM2) raw material (3 mg) in the paw oedema models induced by carageenan after 60 min to inflammatory induction. Each value represents the mean \pm S.E.M. of 6 animals, and asterisks (*) indicate significant inhibition of the paw weight in relation to the corresponding untreated groups (C), $P < 0.05$, and grade (#) indicate a significant statistical difference between RM 1 and R4, $P < 0.05$ 145

Figure 4: Photographs of deflazacort (DFZ) hollow crystal (R4), micronized (RM1) and crystalline (RM2) raw material samples: (A) non-irradiated; (B) UV irradiated (1.2 million lux/hour); (C) temperature and humidity ($40 \pm 2^\circ \text{C}/75 \pm 5\% \text{RH}$)/6 months. 147

Figure 5: HPLC chromatograms of UV irradiated (1.2 million lux/hour) DFZ: (A) reference standard; (B) RM1I*; (C) RM2I*; (D) R4I*. Conditions: C_{18} (250 x 4.6 mm, i.d., 4 μm particle size) column, mobile phase consisted of water:acetonitrile (60:40, v/v), applied at a flow rate of 1.0 mL min^{-1} , injection volume was 20 μL and elution of peaks was monitored at 244 nm. (E) UV spectrum no irradiated and irradiated samples of DFZ. 148

Figure 6: Differential scanning calorimetry (DSC) (A) DFZ reference standard; (B) samples submitted to UV irradiated (1.2 million lux/hour); (C) samples submitted to temperature and humidity ($40 \pm 2^\circ \text{C}/75 \pm 5\% \text{RH}$)/6 months. Dynamic nitrogen atmosphere (50 mL min^{-1}) and heating rate of $10^\circ \text{C min}^{-1}$ 150

Figure 7: Diffuse reflectance infrared Fourier transformed spectroscopy of: (A) DFZ reference standard, (B) UV irradiated (1.2 million lux/hour) samples; (C) samples submitted to temperature and humidity ($40 \pm 2^\circ \text{C}/75 \pm 5\% \text{RH}$)/6 months. 151

Figure 8: X-Ray Diffraction of: (A) DFZ reference standard, (B) UV irradiated (1.2 million lux/hour) samples; (C) samples submitted to temperature and humidity ($40 \pm 2^\circ \text{C}/75 \pm 5\% \text{RH}$)/6 months. 152

Figure 9: Photoisomerization pathway of 11β -hydroxy steroid (SHIRASAKI et al., 2004). 154

Figure 10: (I) (A) Total ion chromatograms (TIC) and all mass; (B) total ion chromatograms (TIC) and mass 442; (C) UV chromatogram 244 nm; (D) UV pick 14.1 min; (E) mass of pick 14.1 min. (II) Magnification of (I). (F) Total ion chromatograms (TIC) and all mass; (G) total ion chromatograms (TIC) and mass 442; (H) UV

| | |
|--|-----|
| chromatogram 244 nm; (I) UV pick 14.1 min; (J) mass of pick 14.1 min. | 155 |
| Figure 11: ¹ H NMR spectra of DFZ: (A) DFZ reference standard; (B) R4I* UV irradiated. | 156 |
| Figure 12: RAW 264.7 cell viability in 24 hours after incubation with LPS (control group), or R4 UV-irradiated (R4 I*) or non-irradiated DFZ (R4) reference standard at concentrations 50, 100 or 300 µg/mL in the medium. Bars represents the mean of cell viability (%) evaluated in triplicate and * P<0.05, statistical difference between treatment and the control group. | 157 |
| Figure 13: Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression levels modulated by LPS. R4 UV irradiated (R4 I*) and non-irradiated DFZ reference standard in RAW 264.7 cells. Results were expressed as 2 ^{-(ΔΔCT)} and means that values below one show an increase in gene expression while values above one demonstrate gene expression inhibition. | 158 |
| Figure 14: Inducible cyclooxygenase-2 (COX-2) gene expression levels modulated by LPS. Irradiated R4I* and DFZ non-irradiated compounds in RAW 264.7 cells. Results were expressed as 2 ^{-(ΔΔCT)} and means that values below one show an increase in gene expression while values above one demonstrate gene expression inhibition. | 158 |
| Figure 15: Schematic representation to explain the points to interaction between glucocorticoids and glucocorticoids-receptor. Legend: black dashed lines - hydrogen bonds, salt bridges, metal interactions; green solid lines - hydrophobic interactions; green dashed lines - Pi-Pi, Pi-cation interactions. Note: covalent bonds to proteins are not displayed (Interactions for instance 1P93:DEX:A:1999). (Adapted from http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1P93). | 161 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta H_{\text{fusão}}$ - Variação da entalpia de fusão

$\Delta\mu/(kBT)$ – Força impulsora

2DNG – Nucleação bidimensional

ABI PRISM Step one Sequence Detection System: A ABI PRISM ® 7000 Sequence Detection System (7000 SDS instrumento) é um instrumento de detecção de sequência de segunda geração capaz de detecção quantitativa e qualitativa com produtos químicos à base de PCR fluorescente.

ANOVA -Análise de Variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AP-1 - Activator protein 1 transcriptional responses;

API - Active Pharmaceutical Ingredient (Insumo farmacêutico ativo)

AUC - Área under the curve

BCS - Biopharmaceutical Classification System (Sistema de Classificação Biofarmacêutica)

CBZ - Carbamazepine (Cabamazepina)

CBZ-C - Hollow crystal of Carbamazepine (cristais ocos de carbamazepina)

CBZ-RM - Carbamazepine raw material (carbamazepina matéria prima)

CDKN1C - a cell cycle regulator

cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar

CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia da Universidade Federal de São Paulo

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CMC - Concentração Micelar Crítica

COX - Ciclooxygenase

COX-2 - Ciclooxygenase tipo 2

DE - Eficiência de dissolução

DFZ - Deflazacort (Deflazacorte)

DFZ-RM - Deflazacort raw material (deflazacorte matéria-prima)

DIM - Microscopia de contraste de interferência diferencial

DMSO - Dimethylsulfoxide (dimetilsulfóxido)

dNTP mixture - Solução pré-misturada contendo sais de sódio de dATP, dCTP, dGTP e dTTP.

DRIFT - Diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy

DRX – Difração de raios X

DSC - Diferencial Scanning Calorimetry

DUSP1: dual specificity phosphatase

GPCRs: Gαq-linked G protein-coupled receptors

HPLC – High-Performance Liquid Chromatography
ICH – International Conference on Harmonization
IDR – Intrinsic Dissolution Rate (Velocidade de dissolução intrínseca)
iNOS - Óxido nítrico sintase induzível
I- κ B - Inibidor da kappa B.
JUN N-terminal kinase signaling
LCM – Microscopia confocal a laser
LCM-DIM - Laser confocal differential interference contrast microscopy (Microscopia confocal a laser combinada com a microscopia de contraste de interferência diferencial)
LPS - Lipopolissacarídeo de *Eschericia coli*
LSS – Lauril sulfato de sódio
MAPK: mitogen-activated protein kinases
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
MTT - (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NF- κ B: fator de transcrição nuclear kappa B
NO: óxido nítrico.
PCR - reação em cadeia de polimerase
PGE₂ - Prostaglandina E2
PLA2 - Fosfolipase A2
R4 - Hollow crystal of DFZ (Cristal oco do DFZ cristalizado)
RAW 264.7 - linhagem de célula de macrófagos murinos
RGS2 - regulator of G-protein signalling 2
RH - relative humidity
RM1 – DFZ micronized raw material 1 (DFZ micronizado)
RM2 – DFZ crystalline raw material 2 (DFZ não micronizado)
RNA - Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)
SD – Standard deviation
SDS – Sodium dodecyl sulfate (Lauril sulfato de sódio)
SEM - Scanning electron microscopy (microscopia eletrônica de varredura)
T_{peak} – Temperatura *peak*
T_{endset} – Temperatura *endset*
TG – Thermogravimetry (Termogravimetria)
TNF- α - fator de necrose tumoral alfa
T_{onset} - Temperatura *onset*
TSC22D3 - Glucocorticoid-induced leucine zipper
UR – Umidade relativa
USP – United States Pharmacopoeia
UV – Radiação ultravioleta
VDI – Velocidade de dissolução intrínseca

XRCD – X-ray crystal diffraction (Difração de raios-X de cristal)

XRPD - X-ray powder diffraction (Difração de raios-X de pó)

ZFP36 - Trisaprolin

Δm – Variação de massa

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| INTRODUÇÃO GERAL | 29 |
| OBJETIVOS | 33 |
| OBJETIVO GERAL | 33 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 33 |
| 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 36 |
| 2. CRISTALIZAÇÃO | 37 |
| 3. MECÂNISMO DE CRESCIMENTO DOS CRISTAIS | 40 |
| 4. MECANISMO DE CRESCIMENTO DOS CRISTAIS OCOS | 43 |
| 5. ESTADO SÓLIDO | 45 |
| 6. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO SÓLIDO | 46 |
| 6.1 Microscopia | 46 |
| 6.2 Difração de Raios X (XRPD) | 47 |
| 6.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (DRIFT) | 48 |
| 6.4 Técnicas termoanalíticas | 48 |
| 6.5 Tamanho de partícula | 49 |
| 7. ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO | 49 |
| 8. ESTUDOS DE ESTABILIDADE | 51 |
| 9. ESTUDOS <i>IN VIVO E IN VITRO</i> DA ATIVIDADE BIOLÓGICA | 52 |
| 10. DEFLAZACORTE E CARBAMAZEPINA | 54 |
| CAPÍTULO 2: ARTIGO 1 – HOLLOW CRYSTAL ANTISOLVENT PREPARATION PROCESS AS A PROMISING TECHNIQUE TO IMPROVE DISSOLUTION OF POORLY SOLUBLE DRUGS | 57 |
| 1. INTRODUCTION | 62 |
| 2. MATERIALS AND METHODS | 64 |
| 3. RESULTS AND DISCUSSION | 67 |
| 4. CONCLUSION | 75 |
| REFERENCES | 76 |
| CAPÍTULO 3: ARTIGO 2 – DISSOLUTION ENHANCEMENT OF DEFLAZACORT USING HOLLOW CRYSTALS PREPARED BY ANTISOLVENT CRYSTALLIZATION PROCESS | 81 |
| 1. INTRODUCTION | 85 |
| 2. MATERIAL AND METHODS | 86 |
| 3. RESULTS AND DISCUSSION | 91 |
| 4. CONCLUSIONS | 100 |
| REFERENCES | 101 |

| | |
|---|------------|
| CAPÍTULO 4: ARTIGO 3– CRYSTAL GROWTH MECHANISMS OF DEFLAZACORT HOLLOW CRYSTAL: ENVOLVIMENT TO BERG EFFECT | 107 |
| 1. INTRODUCTION | 111 |
| 2. MATERIALS AND METHODS..... | 113 |
| 3. RESULTS AND DISCUSSION | 115 |
| 4. CONCLUSIONS..... | 128 |
| REFERENCES | 129 |
| CAPÍTULO 5: ARTIGO 4 - DEFLAZACORT HOLLOW CRYSTAL: ANTI-INFLAMMATORY EFFECT AND ITS STABILITY | 133 |
| 1. INTRODUCTION | 137 |
| 2. METHODOLOGY | 139 |
| 3. RESULTS AND DISCUSSION | 144 |
| 4. CONCLUSIONS..... | 161 |
| REFERENCES | 162 |
| CAPÍTULO 6: DISCUSSÃO GERAL | 169 |
| CONCLUSÕES | 183 |
| REFERÊNCIAS..... | 185 |

INTRODUÇÃO GERAL

O sistema de classificação biofarmacêutica (BCS) classifica os fármacos em classes I, II, III ou IV, de acordo com a solubilidade e permeabilidade. Aproximadamente 40% dos fármacos são de classe II (baixa solubilidade-alta permeabilidade) e classe IV (baixa solubilidade-baixa permeabilidade), podendo apresentar problemas de biodisponibilidade. Pesquisas com o objetivo de aumentar a solubilidade de fármacos pouco solúveis têm sido amplamente realizadas, utilizando técnicas como: modificação do cristal, redução de tamanho do cristal (micronização), amorfização, complexação com ciclodextrinas, emulsificação e uso de surfactantes nas formulações (KAWABATA et al., 2011).

Estudos utilizando métodos de micronização demonstraram que existe uma relação entre as propriedades mecânicas e o aumento da energia superficial (HENG et al., 2006; PERKINS et al., 2009; GAISFORD et al., 2010). O processo de micronização, embora amplamente utilizado na área farmacêutica, não garante uma melhora no perfil de dissolução e biodisponibilidade para alguns fármacos, devido à formação de carga estática, aglomeração das partículas, baixa fluidez e, principalmente, baixa molhabilidade (PERRUT et al., 2005).

O processo de cristalização é uma técnica empregada na purificação, processos de separação, e é um ramo da tecnologia de partículas amplamente utilizada em processos de obtenção de fármacos (DAVEY; GARSIDE, 2002). A cristalização afeta diretamente as propriedades do estado sólido, assim como a estabilidade e desempenho do produto final (SHEKUNOV; YORK, 2000). Este processo também pode beneficiar a formação dos cristais com características que podem levar a um incremento da velocidade de dissolução. Uma das técnicas de cristalização utilizada para a obtenção de cristais ultrafinos é o método por antissolvente, que é um método rápido, fácil de executar e que pode utilizar solventes de baixa toxicidade, como a água (VIÇOSA et al., 2012).

Os cristais puros têm sido estudados principalmente na área de compostos inorgânicos, sendo uma estratégia ainda pouco estudada para compostos orgânicos e, principalmente para fármacos. O mecanismo de formação de cristais ainda é bastante complexo, e estudos destes são escassos na literatura. O estudo e o conhecimento dos mecanismos de formação, desempenho de dissolução e estabilidade dos cristais auxiliam na padronização para obtenção de hábitos cristalino diferenciados e contribui

para o desenvolvimento de fármacos com melhores características de dissolução e biodisponibilidade.

A caracterização do estado sólido das matérias-primas e dos cristais obtidos é crucial (CHEN et al., 2011; GARCIA et al., 1999; SHEKUNOV; YORK, 2000). Diversas técnicas são utilizadas nestes estudos, sendo que as principais são a microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura, a difração de raios X, a análise térmica e a espectroscopia do infravermelho. Além destas, o perfil de dissolução e a velocidade de dissolução intrínseca devem ser avaliados, pois podem nos fornecer informações importantes com relação ao comportamento do fármaco em meio aquoso, sendo um importante aliado no controle de qualidade.

O deflazacorte (DFZ) é um glicocorticóide indicado no tratamento de doenças inflamatórias, apresentando relatos na literatura de provocar menos efeitos colaterais quando comparado a outros medicamentos desta mesma classe. O DFZ apresenta baixa solubilidade, havendo relato na literatura de problemas com relação ao perfil de dissolução de formas farmacêuticas já comercializadas. Estes problemas podem ter como origem a formulação, processo de fabricação, mas principalmente as características sólidas do fármaco utilizado (ABDOU et al, 2000). Para o DFZ não existem estudos quanto à micronização e no mercado brasileiro foram encontradas matérias-primas na forma micronizada e não micronizada.

A carbamazepina foi utilizada comparativamente no presente trabalho por apresentar baixa solubilidade, relatos de vários polimorfos, haver estudos de formação de cristais ocultos com o fármaco e por apresentar alterações na superfície da partícula durante o processo de micronização (PERKINS et al., 2009).

O problema relacionado à baixa solubilidade dos fármacos, associado aos problemas encontrados devido à técnica de micronização levam a necessidade de alternativas para incrementar a velocidade de dissolução destes fármacos, justificando assim este estudo.

Considerando o exposto, este trabalho contemplou o estudo de cristalização do DFZ e CBZ pelo método do antissolvente utilizando diversas condições. Também foram realizados estudos de caracterização do estado sólido e estudos de dissolução, que possibilitaram avaliar tanto os cristais obtidos quanto as matérias-primas comercializadas. Além destes foram realizados estudos dos mecanismos de cristalização do DFZ assim como o estudo de estabilidade das diferentes matérias-primas e dos cristais ocultos. Para complementar o estudo foram realizados ensaios *in vivo* e *in vitro* para avaliar a atividade anti-inflamatória.

A apresentação deste trabalho está disposta na forma de quatro capítulos sucessivos: revisão bibliográfica; artigo científico (1) intitulado: Hollow crystal antisolvent preparation process as a promising technique to improve dissolution of poorly soluble drugs; artigo científico 2, intitulado: Antisolvent crystallization and the influence of poorly soluble drugs like deflazacort on the dissolution rate; artigo científico 3, intitulado: Crystal growth mechanisms of deflazacort hollow crystal: involvement to Berg effect; artigo científico 4, intitulado: Deflazacort hollow crystal: anti-inflammatory effect and its stability.

Para finalizar o trabalho foi realizada uma discussão geral em função de todos os resultados obtidos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Obter e caracterizar cristais com diferentes hábitos através de métodos de cristalização como estratégia para incrementar a velocidade de dissolução de fármacos pouco solúveis como o Deflazacorte e a Carbamazepina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar o método do antissolvente para obtenção de cristais de DFZ e CBZ com diferentes hábitos cristalinos;
- Caracterizar as matérias-primas do DFZ, da CBZ e dos respectivos cristalizados obtidos através da microscopia eletrônica de varredura, difração de Raios X, análises espectroscópicas, térmicas e eficiência de dissolução;
- Avaliar a influência dos diferentes hábitos e da matéria-prima micronizada na velocidade de dissolução intrínseca e no perfil de dissolução do DFZ;
- Correlacionar às características morfológicas e físico-químicas com o perfil de dissolução;
- Registrar a vídeo cristalização utilizando microscopia óptica com luz polarizada ao longo do tempo;
- Elucidar os mecanismos de formação dos cristais de deflazacorte por meio da análise estrutural e morfológica dos cristais;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vivo* dos diferentes hábitos e da matéria prima micronizada do DFZ;
- Avaliar a influência da temperatura, umidade e luz nos diferentes hábitos e material micronizado.
- Avaliar a citotoxicidade e atividade anti-inflamatória *in vitro* das amostras de DFZ submetidas à luz.

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O sistema de classificação biofarmacêutica (BCS) classifica os fármacos em classes I, II, III ou IV de acordo com a solubilidade e permeabilidade, sendo que aproximadamente 40% destes são de classe II (baixa solubilidade-alta permeabilidade) e classe IV (baixa solubilidade-baixa permeabilidade) (AMIDON et al., 1995; YU et al., 2004). O crescimento na pesquisa e descobrimento de novos fármacos levou a um aumento de 70% de fármacos que apresentam baixa solubilidade em água. Atualmente, aproximadamente 40% das formas farmacêuticas orais de liberação imediata são categorizados como praticamente insolúveis ($<100 \mu\text{g} / \text{mL}$) (TAKAGI et al., 2006).

Os fármacos administrados na forma sólida devem dissolver-se na biofase aquosa, sendo que para os de baixa solubilidade a absorção será determinada pela taxa de dissolução. A baixa solubilidade é um fator importante na eficácia terapêutica de um medicamento, pois pode levar a uma baixa absorção e consequentemente diminuir a biodisponibilidade (TRIPATHI, 2006).

Técnicas para melhorar a biodisponibilidade de fármacos com baixa solubilidade em água vêm sendo estudadas (BLAGDEN et al., 2007). As principais técnicas estudadas são a modificação do cristal (polimorfo, formação de sal e cocrystal), uso surfactante nas formulações, redução do tamanho do cristal (micronização), amorfização, complexação com ciclodextrinas, emulsificação entre outras. Estas têm como proposta e objetivo melhorar as características do estado sólido e consequentemente a solubilidade de fármacos pouco solúveis (KAWABATA et al., 2011).

A micronização é um método promissor no aumento do perfil de dissolução devido ao aumento da área superficial das partículas (CHAUMEIL, 1998; KESISOGLU et al., 2007), mas pode apresentar algumas desvantagens, como transição polimórfica, aglomeração das partículas, carga estática, menor fluidez e baixa molhabilidade (PASQUALI et al., 2006). A moagem realizada durante o processo de micronização pode levar a alterações estruturais devido à alta energia inerente e envolve a criação de um grau significativo de desordem no interior da rede cristalina (CHAMARTHY; PINAL, 2008; PERKINS et al., 2009). Tem sido realizados estudos das propriedades superficiais de alguns fármacos submetidos ao processo de micronização, sendo estes a carbamazepina (PERKINS et al., 2009), paracetamol (HENG et al., 2006; HENG; WILLIAMS, 2006), salbutamol (GAISFORD et al.,

2010), revatropato (TICEHURST et al., 2000) e ácido acetilsalicílico (TORRADO et al., 1998), demonstrando assim que podem ocorrer alterações das partículas durante o processo de micronização.

A engenharia de cristais tem uma série de rotas de processos de cristalização que também podem ser utilizadas para melhorar a velocidade de dissolução de fármacos pouco solúveis (BLAGDEN et al., 2007).

2. CRISTALIZAÇÃO

A cristalização é o processo (natural ou artificial) da formação de cristais sólidos de uma solução uniforme, onde átomos, íons ou moléculas são empacotados. Quando este empacotamento ocorre de forma regular, formando uma rede tridimensional infinita, este material é denominado de cristalino (DAVEY; GARSIDE, 2002). O arranjo atômico dentro de amostras com estrutura periódica, tais como um sólido cristalino, é descrita em termos de cela unitária. Cada cela possui uma unidade de repetição química idêntica. Estas são empilhadas em espaço tridimensional descrevendo o arranjo de átomos em grandes quantidades da estrutura do cristal. A rede tridimensional, em cada cela unitária é descrita por um conjunto de posições atômicas (x_j , y_j e z_j) e os planos de rede descrevem planos tridimensionais não-colineares de arranjos atômicos (DONG; BOYD, 2011).

A primeira etapa da cristalização é a escolha do solvente, sendo importante conhecer a solubilidade e suas mudanças em função da temperatura. O solvente mais comum é a água e esta, adicionada em pequenas quantidades em solventes orgânicos, aumenta o rendimento e a taxa de crescimento de cristais de compostos farmacêuticos. Mudanças no solvente têm diversos efeitos relacionados principalmente à solubilidade, supersaturação, interação com soluto, faces cristalinas e energia superficial podendo modificar o mecanismo de crescimento (ABBONA; AQUILANO, 2010). A força da energia de interação soluto-solvente está relacionada com a solubilidade do soluto, a nucleação, e as taxas de crescimento dos cristais (SUNAGAWA, 1999). Esta interação é mais acentuada em soluções supersaturadas e as moléculas de solventes são temporariamente adsorvidas em vários sítios da superfície do cristal exercendo um efeito sobre as taxas de crescimento (ABBONA; AQUILANO, 2010).

Diversos métodos são utilizados no processo de cristalização, no entanto, a maioria deles depende de uma redução da solubilidade. A solubilidade de uma substância sólida é a concentração em que a fase líquida da solução está em equilíbrio com a fase sólida a uma determinada temperatura e pressão. Nestas condições o sólido não solubiliza e não cristaliza, sendo esta chamada de solução saturada. Uma solução supersaturada é necessária para que ocorra o processo de cristalização, portanto em soluções insaturadas não há cristalização (BYRN et al., 1999). A curva de solubilidade hipotética em função da temperatura, adaptada de Davey & Garside (2002), está demonstrada na figura 3. Concentrações abaixo da curva de solubilidade são insaturadas e os cristais dissolverão, enquanto acima da curva a solução será supersaturada, podendo levar à nucleação e consequente cristalização (DAVEY; GARSIDE, 2002).

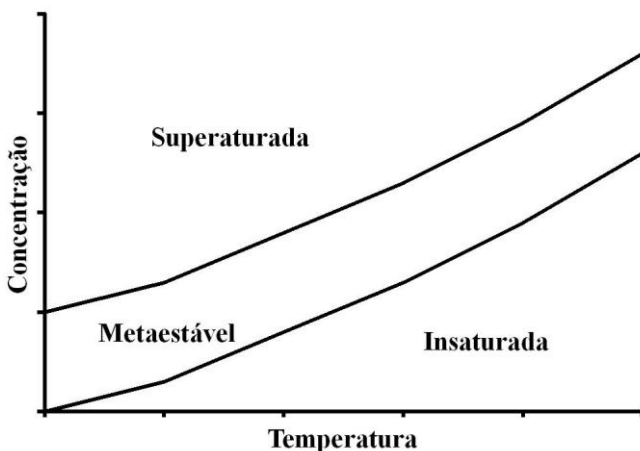


Figura 1: Curva de solubilidade hipotética adaptada de Davey & Garside (DAVEY; GARSIDE, 2002).

Diversas técnicas são utilizadas mundialmente nos processos de cristalização e uma destas é a cristalização através do uso de antissolvente, que tem como princípio básico a utilização de um solvente, onde o fármaco é solúvel e a de um antissolvente, onde o fármaco é insolúvel. A adição do antissolvente leva a supersaturação, ocorrendo o processo de cristalização (VIÇOSA et al., 2012). Este método tem a vantagem de ser simples, rápido e fácil de executar, além

de poder utilizar solventes com baixa ou nenhuma toxicidade, como a água. Também é um método promissor no preparo de partículas ultrafinas, o que pode melhorar o perfil de dissolução e a biodisponibilidade (DONG et al., 2009; WANG et al., 2007). Estudos têm demonstrado que esta técnica de cristalização em condições suaves pode ser um método simples e útil na obtenção de partículas de fármacos pouco solúveis com redução e estreita distribuição de tamanho de partícula e aumento da taxa de dissolução. Métodos de cristalização como o de evaporação de solvente exigem equipamentos de custo alto e grande quantidade de energia, tornando a cristalização por antissolvente um método bastante promissor (CHO et al., 2010; VIÇOSA et al., 2012).

Atualmente a maioria dos fármacos apresentam características hidrofóbicas, permitindo assim o uso da água como antissolvente. A água apresenta uma série de vantagens, no entanto, uma desvantagem é a baixa miscibilidade com solventes orgânicos. Fatores como a relação solvente/antissolvente, temperatura e agitação interferem na morfologia e no tamanho do cristal (HATKAR; GOGATE, 2012).

O processo de cristalização é uma técnica amplamente empregada para produzir uma variedade de materiais na indústria farmacêutica, e impacta diretamente nas propriedades do estado sólido, assim como na estabilidade e desempenho do produto (SHEKUNOV; YORK, 2000). Uma modificação no empacotamento das moléculas, decorrentes das diferentes conformações e/ou interações intra e intermoleculares levam a alterações da estrutura cristalina, sendo denominado de polimorfismo (BRITAIN, 2009; BYRN et al., 1999; CUFFINI et al., 2009). Estas diferenças podem provocar alterações significativas nas propriedades físico-químicas tais como ponto de fusão, densidade, morfologia, solubilidade e cor. Isto por sua vez pode ter um impacto na estabilidade físico-química, biodisponibilidade e processabilidade durante a fabricação do produto final (CHIENG et al., 2011). O processo de cristalização pode levar à formação de polimorfos, sendo importante reconhecer e estar apto a controlar este fenômeno, pois cada polimorfo tem características mecânicas, térmicas e físicas próprias (DAVEY; GARSIDE, 2002). A transformação polimórfica pode ser avaliada por várias técnicas analíticas disponíveis para caracterizar e monitorar o estado sólido de insumos farmacêuticos ativos. A escolha da técnica depende da profundidade das informações necessárias. O método de escolha para avaliação polimórfica é a difração de Raios X, pois cada polimorfo apresenta um padrão de difração específico. Métodos espectroscópicos também podem ser utilizados e avaliam interações

intra e intermoleculares, podendo fornecer informações estruturais. Entretanto não avaliam diretamente a estrutura cristalina (CHIENG et al., 2011).

O hábito cristalino está relacionado com a aparência externa do cristal e depende das condições de crescimento. Este é resultado da velocidade de crescimento das diferentes faces do cristal. Diversos fatores interferem no hábito cristalino e têm diferentes efeitos. Esses fatores podem ser internos, dependentes da estrutura do cristal (polimorfismo) e dos defeitos cristalinos; e externos, tais como, a supersaturação, natureza do solvente, composição da solução, impurezas e condições físicas (temperatura, fluxo, campo magnético, ultrassom, etc.) (ABBONA; AQUILANO, 2010).

A face maior do cristal corresponde àquela que cresce mais lentamente e dependerá das afinidades relativas do soluto pelo solvente e pelas faces em crescimento do cristal. Cada molécula é constituída de grupamentos funcionais, podendo ser polares ou apolares. Dependendo da geometria de empacotamento das moléculas no retículo, algumas faces podem apresentar mais grupamentos polares expostos, enquanto outras podem ser relativamente apolares. Se o cristal cresce em um solvente polar, a molécula se deposita na face que tornará o cristal mais polar, ou seja, há um crescimento da face apolar, fazendo com que as faces mais polares passem a predominar. Tecnicamente é possível projetar mudanças no hábito cristalino, mediante manipulação deliberada das velocidades de crescimento das diferentes faces do cristal (AULTON, 2008).

Evidentemente, a forma externa do cristal pode afetar as propriedades mecânicas (AULTON, 2008; GAREKANI et al., 2001) e a velocidade de dissolução (AULTON, 2008; RAVAL et al., 2010).

3. MECANISMO DE CRESCIMENTO DOS CRISTAIS

A formação de cristais tem sido amplamente estudada (SCHUSTER et al., 2011). Este processo acontece através da nucleação, onde espécies químicas, átomos, íons ou moléculas depositam-se em um núcleo, camada por camada, até o crescimento do cristal, podendo este apresentar diferentes hábitos e estruturas cristalinas que são dependes do material, mecanismo de formação, velocidade e tipo de cristalização (CHEN et al., 2011). O crescimento de cristais em solução ocorre exclusivamente na interface sólido-líquido. Dependendo da estrutura

atômica desta interface, a relação entre o mecanismo de crescimento e a velocidade de crescimento versus a força impulsora ($\Delta\mu/(k_B T)$) são diferentes, resultando em diferentes morfologias (SUNAGAWA, 2010). Esta força impulsora é expressa de uma forma geral pela diferença de potencial químico entre a interface de sólidos e líquidos ($\Delta\mu/(k_B T)$). Esta interface pode ser classificada atômicamente em lisa ou rugosa, sendo que na interface lisa, o mecanismo de crescimento pode ser por nucleações bidimensionais (2DNG) ou em espiral, enquanto na interface rugosa pode ser do tipo adesiva. Cristais poliédricos e em formato de funil (Hopper) são formados na interface lisa, enquanto dendritos, esferulitas e fractais são formados na região rugosa (SUNAGAWA, 2005). A formação de cristal em funil foi estudada por Berg, que mostrou experimentalmente que a concentração na superfície do cristal é variável, sendo maior nas bordas e cantos, levando ao um crescimento menor da parte central da face (BERG, 1938). A figura 2 foi adaptada de Sunagawa (2010) e apresenta um esquema ilustrativo da evolução morfológica do crescimento dos cristais versus a força impulsora. O hábito cristalino pode mudar com o aumento da força impulsora ($\Delta\mu/(k_B T)$), que está relacionada à supersaturação, podendo variar desde poliédrica até fractal (SUNAGAWA, 2010).

Estudos também demonstraram experimentalmente a evolução do hábito cristalino de crescimento dos cristais desde poliédrico até formas ramificadas, conforme demonstrado na figura 3, adaptada de Oaki e Imai (2003).

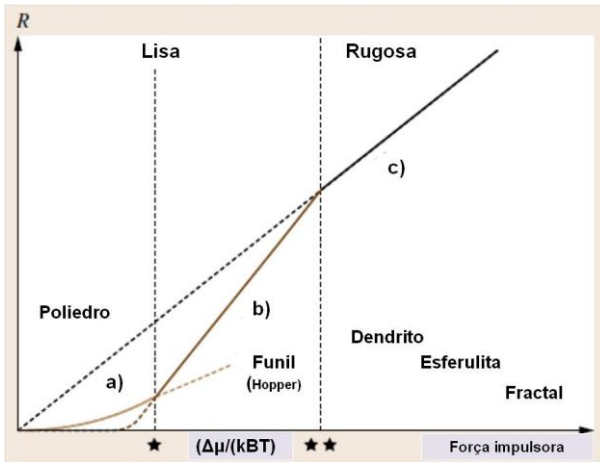


Figura 2: Figura ilustrativa da evolução morfológica da velocidade de crescimento versus força impulsora ($\Delta\mu/(kBT)$). Curva (a) corresponde ao crescimento em espiral, curva (b) 2DNG e curva (c) mecanismo de crescimento tipo adesivo. Dois pontos críticos de força impulsora $\Delta\mu/(kBT)^*$ e $\Delta\mu/(kBT)^{**}$ são mostrados e são indicadas as regiões onde o crescimento poliédrico, funil, dendrítico, esferulita e fractal são esperados. Adaptado de Sunagawa (SUNAGAWA, 2010).

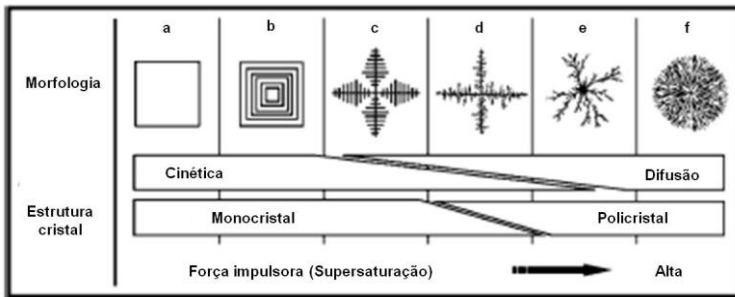


Figura 3: Modelo esquemático da evolução morfológica com o aumento da força impulsora; (a) forma poliédrica, produzida por cinética controlada, com um sistema próximo ao equilíbrio; (b) morfologia com formato de funil, devido efeito Berg; (c) dendrito ordenado com simetria cristalográfica; (d) dendrito parcialmente desordenado com um tronco monocristalino ordenado e ramos laterais desordenados policristalino; dendritos policristalinos desordenados como ocorre na agregação por difusão limitada; (e) e (f) morfologia de ramificação densa. Adaptado de Oaki e Imai (OAKI; IMAI, 2003).

4. MECANISMO DE CRESCIMENTO DOS CRISTAIS OCOS

Uma revisão da literatura mostrou que o interesse por cristais ocos vem aumentando constantemente em diversas áreas em função das propriedades que estes podem apresentar, sendo que a maioria das pesquisas tem sido realizada com compostos inorgânicos (YANG et al., 2010), enquanto poucos relatos existem para compostos orgânicos (MARTINS et al., 2011). Os cristais ocos têm recebido uma considerável atenção quanto as suas propriedades incluindo grande e específica área superficial. Esferas ocas e nanotubos têm ampla aplicação em catálise, liberação de fármacos, sensores químicos, biotecnologia, equipamentos elétricos e fotoelétricos (BORCHERT; SUNDMACHER, 2011; FAURE et al., 2003; SCHUSTER et al., 2010).

A formação dos cristais ocos resulta de um crescimento especial, sendo este complexo e com diferentes mecanismos relatados na literatura.

Um dos mecanismos descritos para obtenção de cristais ocos inorgânicos é o crescimento reverso do cristal (GREER et al., 2009; MOREIRA et al., 2011; YANG et al., 2010; ZHOU, 2010). Este processo consiste de três estágios: agregação de nanopartículas, cristalização da superfície externa e seguida por uma cristalização da superfície ao centro do cristal (ZHOU, 2010). Recentemente, cristais ocos de um composto orgânico foram obtidos através deste mecanismo (SANDER et al., 2012).

O Ibuprofeno foi submetido ao método de fusão e cristalização por sonocristalização e foram obtidos cristais aglomerados com diferentes hábitos cristalinos, tais como agulhas, placas, e alguns tubos ocos. Houve um aumento significativo da solubilidade e velocidade de dissolução intrínseca dos cristais obtidos, devido ao aumento da área superficial após o tratamento com energia ultrassônica (MANISH et al., 2005).

O mecanismo de transição de fases do 2-ceto-l-gluconato sódico hidrato ou solvato para uma fase anidra permite a obtenção de cristais ocos (DETTE et al., 2007). Estudos tem reportado a formação de cristais ocos através deste mecanismo (DETTE et al., 2007; DETTE, S. S. et al., 2010; DETTE, S.S. et al., 2010; MALLET et al., 2004).

Cristais ocos foram obtidos a partir da dexametasona utilizando o método de spray em antissolvente. Estes foram solvatados a partir de uma solução saturada em dimetilsulfóxido ou dimetilformamida. Através de uma seringa e um filtro de vidro esta solução saturada foi

constantemente injetada em água a temperatura ambiente, obtendo capilares (*wiskers*) na superfície dos cristais ocos. Algumas condições foram necessárias para obtenção de cristais ocos, como o soluto ter uma elevada solubilidade no solvente 1 da fase inicial, onde cristaliza como um solvato; soluto é quase insolúvel no solvente 2; os dois solventes são completamente miscíveis e o produto cristaliza imediatamente no antissolvente (MALLET et al., 2004).

Outro mecanismo relatado para compostos orgânicos é o de difusão limitada (EDDLESTON; JONES, 2010; PERRY et al., 2013; POODT et al., 2009). Cristais tubulares de cafeína, carbamazepina, carbamazepina dihidrato, teofilina monohidrato foram obtidos através do método de cristalização por evaporação (EDDLESTON; JONES, 2010). Durante o processo de cristalização, há uma sobressaturação constante ao longo de toda a face de crescimento do cristal quando não há limitações na difusão das moléculas. A rugosidade da superfície é restringida em microescala e macroscopicamente as faces estão crescendo sob condições cinéticas de superfície controladas. Em contraste, no crescimento de difusão limitada, uma supersaturação não homogênea aparece na face de crescimento (NANEV, 2000). Cristais ocos de compostos farmacêuticos foram obtidos através do método de evaporação em solvente e o mecanismo proposto foi o crescimento do cristal por difusão limitada. Dois fatores são importantes neste mecanismo: crescimento anisotrópico do cristal, onde uma face cresce diversas vezes mais rápido que as outras e altos níveis de saturação, levando a altas taxas de cristalização e um crescimento de difusão limitada (EDDLESTON; JONES, 2010). Recentemente, Perry e colaboradores (2013) observaram o crescimento de cristais ocos de ácido salicílico pelo método de difusão limitada e demonstraram que durante o crescimento da face (001), o fluxo foi maior nas bordas (gradiente de concentração mais acentuada) que no centro da face. Em contraste, o crescimento da face (110) e (1-10) estava sob controle misto de difusão/superfície cinética.

Martins e colaboradores (2011) reportaram outro mecanismo para alguns compostos farmacêuticos com diferentes estruturas químicas, hábitos cristalinos e ponto de fusão, utilizando o método de gradiente térmico. Cristais ocos aciculares foram obtidos a partir de compostos orgânicos covalentes (glicina, ácido salicílico, sacarina, barbital, fenobarbital, derivados de hidantoína, ácido succínico, cafeína, teofilina anidra, acetanilida e acetamida) onde o composto é submetido à fusão e mantido em um gradiente térmico até o crescimento de cristais ocos (MARTINS et al., 2011). Este mostrou a função do fluxo de

aquecimento como uma força impulsora neste mecanismo e a formação dos cristais ocos foram caracterizadas através do transporte de massa dentro das partículas tubulares através da transferência de calor.

O mecanismo de crescimento dos cristais pode ser entendido de duas formas sendo a primeira a difusão de espécies dentro da solução ou o crescimento na superfície do cristal (CUBILLAS; ANDERSON, 2010; SUNAGAWA, 1999). É extremamente importante conhecer e entender estes mecanismos, por ser uma etapa crítica do processo de cristalização.

5. ESTADO SÓLIDO

As características do estado sólido são dependentes dos processos de cristalização e purificação, sendo que as propriedades deste sólido têm um impacto importante na solubilidade e estabilidade dos fármacos (HUANG; TONG, 2004). Estudos estimaram que 80-90% dos compostos orgânicos são capazes de existir em diferentes formas cristalinas, sendo denominadas de polimorfos (CHIENG et al., 2011). Diferenças na energia superficial associados com a forma física (amorfo, polimorfos ou solvatos) levam a diferenças nas propriedades físicas, que podem ocorrer no ponto de fusão, higroscopicidade, solubilidade, perfil de dissolução, estabilidade química e física, atividade superficial, densidade, hábito cristalino, eletrostáticas, propriedades mecânicas e ópticas (HUANG; TONG, 2004). As propriedades biofarmacêuticas podem ser diretamente afetadas por estas diferenças encontradas nas propriedades do estado sólido (CHIENG et al., 2011; HUANG; TONG, 2004).

Para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica é extremamente importante a escolha da forma sólida ideal. Esta escolha geralmente é um compromisso entre as propriedades físicas, químicas, farmacêuticas e biofarmacêuticas. Tradicionalmente a escolha é a forma mais estável, devido a sua menor tendência a transformações de fase sólida. No entanto, formas metaestáveis, são às vezes deliberadamente escolhidas, geralmente por apresentar uma maior velocidade de dissolução e conseqüentemente uma melhor biodisponibilidade (AALTONEN et al., 2009).

Diversos métodos de cristalização são usados para obtenção de material sólido e estes processos irão interferir diretamente nas propriedades físicas, químicas e biofarmacêuticas do sólido obtido (AALTONEN et al., 2009). As características químicas e físicas destes

sólidos devem ser rigorosamente controladas. Atualmente diversas técnicas estão disponíveis para este controle.

6. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO SÓLIDO

Devido às diferentes formas encontradas no estado sólido, uma ampla variedade de técnicas analíticas está disponível para os estudos de caracterização e transformação de fármacos (CHIENG et al., 2011).

6.1 Microscopia

As técnicas microscópicas são amplamente utilizadas no estudo dos materiais, pois permitem avaliar tanto a morfologia, superfície, estrutura e composição, dependendo do tipo de equipamento utilizado (PADILHA; FILHO, 2004).

A microscopia óptica está dividida em duas classes: luz refletida ou luz transmitida. A luz refletida revela detalhes de superfície, tamanho, opacidade tais como aglomerados enquanto a luz transmitida, especialmente a luz polarizada, permite a observação em escalas menores (BYRN et al., 1999). A luz polarizada é criada pela passagem de luz através de um filtro de polarização, que transmite a luz em apenas uma direção. A forma na qual os materiais interagem com a luz polarizada pode fornecer informações sobre sua estrutura e composição. Cerca de 90% de todas as substâncias sólidas têm propriedades ópticas que variam com a orientação da luz incidente (materiais anisotrópicos). Quando esses materiais anisotrópicos são girados, o observador pode ver alterações de brilho e / ou de cor ('pleocroísmo') sob a luz polarizada que depende da orientação do material no caminho da luz. Essas alterações podem ser usadas para caracterizar e identificar diversos materiais (PADILHA; FILHO, 2004).

A microscopia eletrônica de varredura é uma ferramenta versátil e amplamente utilizada, pois permite o estudo da morfologia e composição de materiais físicos e biológicos (BYRN et al., 1999; SHUR; PRICE, 2012). O microscópio eletrônico de varredura (SEM) é um tipo de equipamento em que uma amostra é submetida a uma varredura com um feixe de elétrons. Os elétrons interagem com os átomos que formam a amostra produzindo sinais que contêm informações sobre a topografia da superfície da amostra, a composição,

e outras propriedades, tais como condutividade elétrica (VERNON-PARRY, 2000). SEM alcança resoluções extremamente altas até alguns nanômetros e tem um campo de visão muito flexível, tornando esta uma ferramenta muito poderosa (SHUR; PRICE, 2012).

A microscopia confocal a laser é uma técnica utilizada para aumentar o contraste da imagem microscópica e construir imagens tridimensionais através da utilização de um orifício de abertura, que permite uma grande definição de imagem. A característica fundamental da microscopia confocal é a sua capacidade de produzir imagens de alta resolução de amostras espessas em várias profundidades (SHUR; PRICE, 2012). A microscopia confocal a laser (LCM) combinada com a microscopia de contraste de interferência diferencial (DIM) permite avaliar a microtopografia de superfície dos cristais *in situ* (SAZAKI et al., 2005, 2012). LCM-DIM possibilita a observação de materiais transparentes, tais como macromoléculas biológicas e cristais em alta resolução (YANAGIYA; GOTO, 2010).

Estas técnicas de microscopia permitem a investigação em profundidade da superfície e propriedades físico-químicas dos materiais (SAZAKI et al., 2012; SHUR; PRICE, 2012).

6.2 Difração de Raios X (XRD)

O uso da difração de raios X vem aumentando consideravelmente na área farmacêutica devido à interação com outras áreas científicas e a disponibilidade de linhas de luz Síncrotron (DONG; BOYD, 2011).

A difração de raios X dos policristais baseia-se na propriedade intrínseca de cada cristal em desviar, em um ângulo específico, a direção dos raios X emitidos sobre ele. O ângulo de desvio da radiação é único para cada forma do cristal, permitindo assim caracterizá-lo. A denotação matemática deste desvio é descrita pela Lei de Bragg (SKOOG et al., 2002). Os difratogramas gerados são característicos e distintos para cada substância, os quais são formados por um conjunto de linhas ou picos, apresentando diferentes intensidades e posições (distâncias interplanares “d”). Para uma dada substância, as posições dos picos são essencialmente fixas e características. As intensidades podem variar um pouco entre diferentes amostras, dependendo do método de preparação da amostra e condições instrumentais (BRITTAIN, 2001).

6.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (DRIFT)

A espectroscopia do infravermelho é usada na caracterização de compostos farmacêuticos sólidos e tem sido utilizada como uma técnica suplementar na investigação da interação fármaco-excipiente. É uma técnica não invasiva, pois não utiliza energia térmica ou mecânica durante o preparo da amostra, prevenindo as transformações no estado sólido (BUGAY, 2001; STEPHENSON et al., 2001). Esta técnica baseia-se na exposição da amostra a uma radiação eletromagnética de comprimento de onda na região do infravermelho, mensurando a absorção desta radiação pela molécula em análise. Esta absorção resulta de modificações na energia vibracional da molécula em um determinado momento dipolar, o que permite identificar o tipo de ligação presente (SKOOG et al., 2002).

A espectroscopia do infravermelho é utilizada para avaliar a identidade de matérias-primas usadas na produção de medicamentos e na identificação de fármacos. A identificação baseia-se nas bandas de absorção que certos grupos originam na mesma frequência (WATSON, 1999).

6.4 Técnicas termoanalíticas

Análise térmica é uma técnica instrumental disponível em pesquisas farmacêuticas e consiste na medida de propriedades físicas ou químicas de uma substância em função da temperatura e/ou do tempo (BYRN et al., 1999). As mais empregadas são calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise térmica diferencial (DTA) e termogravimetria (TG) e informações importantes podem ser obtidas através destas técnicas.

O DSC é a técnica onde o material a ser analisado é aquecido, refrigerado ou mantido isotermicamente e transições ou eventos energéticos são investigados como uma função do tempo ou a temperatura contra um padrão de referência. As velocidades de aquecimento ou de arrefecimento estão normalmente entre $0,2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e $50\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Tem aplicações no estudo das transições vítreas, avaliação do grau de amorfização em materiais cristalinos, polimorfismo, solubilidade de fármacos em polímeros, caracterização e

compatibilidade fármaco-excipiente (FORD; MANN, 2012; FORD; TIMMINS, 1989).

A análise termogravimétrica é uma técnica termoanalítica na qual a variação de perda ou ganho de massa da amostra é determinada em função da temperatura e/ou do tempo, enquanto a amostra é submetida a uma variação controlada de temperatura (FORD; TIMMINS, 1989). Este ensaio pode fornecer informações como dessolvatação, cinética de decomposição, desidratação, degradação e transição de polimorfos (BYRN et al., 1999; FORD; TIMMINS, 1989).

6.5 Tamanho de partícula

O conhecimento do tamanho e da distribuição do tamanho de partícula é um pré-requisito fundamental para muitas operações de produção e processamento de fármacos e medicamentos. Muitas propriedades do estado sólido estão relacionadas ao tamanho de partícula, podendo influenciar na densidade, fluidez, capacidade de mistura e segregação (BYRN et al., 1999). Além disso, o tamanho de partícula também tem um efeito significativo no perfil de dissolução, biodisponibilidade, e/ou estabilidade (HINTZ; JOHNSON, 1989; ICH, 1999).

Diversas técnicas são utilizadas para determinação de tamanho de partícula, tais como o método de Coulter, espalhamento de luz através laser e a microscopia com aná

lise de imagem (BYRN et al., 1999).

7. ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO

A pesquisa com dissolução teve seu início cerca de 100 anos atrás, como um campo da físico-química e desde então um importante progresso foi feito. No entanto, o interesse explícito na dissolução relacionado a fármacos cresceu apenas após a constatação de que a dissolução é um importante fator na biodisponibilidade de fármacos (DOKOUMETZIDIS; MACHERAS, 2006). Variações na dissolução de um fármaco podem alterar a eficácia terapêutica de uma forma farmacêutica, sendo, portanto mais adequado estudar a velocidade de dissolução do que a própria solubilidade (CUFFINI et al., 2009), visto que a solubilidade é um parâmetro de equilíbrio termodinâmico, característico de cada substância, podendo servir para fins de

identificação e avaliação do grau de pureza (“Farmacopeia Brasileira,” 2010). Solubilidade pode ser definida como a quantidade de uma substância que se dissolve em um dado volume de solvente a uma dada temperatura (ALSENZ; KANSY, 2007). Os ensaios de dissolução são métodos oficiais, aplicados a estudos de cinética de dissolução, e/ou determinação do perfil de dissolução de formas farmacêuticas, sendo este o processo pelo qual um sólido, com características regulares de solubilidade se dissolve (ABDOU et al., 2000). Este é um método oficial, descrito nas farmacopeias para avaliar a liberação do fármaco das formas farmacêuticas sólidas, semissólidas, pós e outros, assim como estudar a cinética de dissolução, e/ou determinação do perfil de dissolução (AZARMI et al., 2007). Este ensaio possibilita determinar a quantidade de substância ativa dissolvida em um meio de dissolução quando o produto é submetido à ação de aparelhagem específica em determinadas condições experimentais (BRASIL, 2010). É usado para controle de qualidade e pesquisa, onde o foco é realizar uma estimativa da liberação do fármaco em relação ao desempenho *in vivo* de um medicamento (AZARMI et al., 2007).

As farmacopeias não apresentam um método oficial para determinar a velocidade de dissolução de pós, no entanto este ensaio para pós finamente divididos pode ser realizado utilizando o Aparato 2 (AZARMI et al., 2007; CHAUHAN et al., 2005; WILLIAMS, et al., 2005).

Alguns fatores afetam as taxas de dissolução, que podem estar relacionados às propriedades físico-químicas tais como o efeito do tamanho da partícula e do estado cristalino. A velocidade de dissolução de um fármaco depende das propriedades do estado sólido, tais como polimorfismo, tamanho de partícula, cristalinidade, solvatação, estado de hidratação e área superficial (ABDOU et al., 2000).

A Velocidade de Dissolução Intrínseca (VDI) é outro ensaio de dissolução que vem sendo estudado e utilizado, com o objetivo de entender as propriedades intrínsecas do fármaco. A VDI consiste em determinar a quantidade acumulada de massa dissolvida de um fármaco por unidade de área por tempo (CUFFINI et al., 2009). A Farmacopeia Americana (USP) traz a metodologia para o ensaio de Velocidade de Dissolução Intrínseca, onde o fármaco é prensado na forma de disco e se avalia a dissolução de uma área superficial constante (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007). A VDI mede a velocidade de transferência de massa por área de superfície dissolvente ($\text{mg cm}^{-2} \text{min}^{-1}$) e as propriedades intrínsecas do fármaco como uma função do meio de dissolução (AULTON, 2008). Para um mesmo fármaco com formas

crystalinas diferentes, a velocidade de dissolução intrínseca em condições *sink* é proporcional a sua solubilidade (BYRN et al., 1999). Esta técnica tem sido bastante utilizada na caracterização do estado sólido (FLICKER et al., 2011; SEHIĆ et al., 2010). Além disto, também tem sido utilizada com o objetivo de avaliar a melhora da velocidade de dissolução de fármacos pouco solúveis, após serem submetidos a algumas técnicas farmacêuticas, tais como: amorfização (AGRAWAL et al., 2004; KARMWAR et al., 2012), obtenção de formas polimórficas diferentes (AGRAWAL et al., 2004; GILCHRIST et al., 2012; LI et al., 2009) e co-cristalização (TSUTSUMI et al., 2011). Entre outros métodos utilizados, tem sido utilizada para auxiliar na classificação biofarmacêutica. Yu e colaboradores determinaram que é possível obter uma correlação entre a VDI e solubilidade, relatando que fármacos com solubilidade maior que $0,1 \text{ mg min}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ são altamente solúveis, enquanto abaixo deste valor indica pouca solubilidade (AMIDON et al., 1995; AYRES et al., 2007; YU et al., 2004). Estudos realizados recentemente sugerem o valor de $1 \text{ mg min}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ como a base de divisão entre as classes de solubilidade (ISSA & FERRAZ, 2011; ZAKERI-MILANI et al., 2009).

8. ESTUDOS DE ESTABILIDADE

O estudo de estabilidade acelerado foi projetado para acelerar a possível degradação química e/ou mudanças físicas de insumos farmacêuticos ativos. Os dados assim obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, podem ser usados para avaliar os efeitos químicos e físicos em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do insumo farmacêutico ativo. As condições climáticas para a realização dos estudos de estabilidade acelerada são de $40 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ / $75\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$ para insumos farmacêuticos ativos, submetido ao armazenamento de até $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Deve ser realizado também o estudo de fotoestabilidade com o objetivo de demonstrar que uma exposição à luz não resulta em alterações significativas do insumo farmacêutico ativo (BRASIL, 2012; ICH, 1996, 2006).

O protocolo do estudo de estabilidade deve contemplar avaliações físicas, químicas, físico-químicas, biológicas e microbiológicas, quando for o caso. Deve ser avaliada, também, a presença ou formação

qualitativa e quantitativa de subprodutos e/ou produtos de degradação, utilizando-se metodologia adequada e validada (BRASIL, 2012).

Os glicocorticóides são exemplos de moléculas bicromóforas, pois apresentam uma cetona na cadeia lateral alifática ligada na posição 17 do anel D e no anel A possui um grupo cetona conjugado com uma ou duas ligações duplas, dependendo do fármaco (Figura 4) (CAFFIERI et al., 2008). Estes devem ser protegidos da luz por sua fotossensibilidade à radiação ultravioleta. A fotoreatividade tem sido descrita na literatura, tanto em solução quanto na forma sólida, e o principal processo de fotodegradação ocorre na cadeia lateral da posição C(17) (ALBINI; FASANI, 1998) e através do rearranjo das dienonas conjugadas do anel A (OGATA et al., 1998; SHIRASAKI et al., 2004). O grupamento cetona ligado ao carbono (3), a ligação dupla presente entre o carbono (4) e (5), a hidroxila ligada ao C (11) e a cadeia β -cetólica no C(17) são essenciais para o efeito terapêutico (CAFFIERI et al., 2008).

Estudos de estabilidade do DFZ em solução mostraram que este é instável em meio básico, apresentando uma degradação da cadeia lateral C(17), formando o composto 21-hidróxi deflazacorte. Tanto o DFZ quanto o produto degradado apresentaram atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* sendo que o 21-hidróxi deflazacorte foi mais potente (PAULINO et al., 2012). Cuffini e colaboradores (2007) avaliaram a estabilidade do DFZ no estado sólido e demonstraram que frente a temperatura e umidade este se manteve estável, no entanto no estudo de fotoestabilidade apresentou degradação.

9. ESTUDOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

O processo inflamatório pode ser definido como uma resposta de um tecido vivo e vascularizado a uma agressão real ou potencial, e é dividido didaticamente em duas categorias, levando-se em consideração sua duração ou tempo de evolução relativa: a inflamação aguda e a inflamação crônica. A inflamação aguda é de curta duração (horas a dias), caracterizada por vasodilatação arteriolar e venular (1), extravasamento de fluído rico em proteínas (plasma) (2) e migração de células, primariamente neutrófilos (3). Em alguns casos ocorre também ativação da cascata da coagulação (CARRAWAY et al., 2003; SPLETTSTOESSER; SCHUFF-WERNER, 2002). A reação

inflamatória crônica é de duração prolongada (semanas, meses ou até anos). Esta é caracterizada por migração leucocitária, com predominância de monócitos, linfócitos, plasmócitos e fibroblastos, além de sinais de regeneração e reconstrução da matriz conjuntiva. Nos processos inflamatórios crônicos, os eventos acima descritos podem originar degeneração tecidual e fibrose (WANNMACHER; FERREIRA, 2004). São exemplos de reação inflamatória crônica a artrite reumatóide, o lupus eritematoso sistêmico, a silicose, a aterosclerose e doenças inflamatórias intestinais (doença de Crohn e colite ulcerativa) (LIEW, 2003).

Os glicocorticóides, juntamente com os anti-inflamatórios não esteroidais, são os principais fármacos usados para o tratamento dos sintomas inflamatórios, incluindo dor, rubor, calor e perda da função do órgão acometido. A sua ação ocorre através da imunorregulação genômica ou não genômica. Na regulação genômica, os glicocorticóides, como o DFZ, difundem passivamente para dentro da célula e no citoplasma, ligam-se aos receptores citoplasmáticos solúveis para glicocorticóides (GR), formando um complexo GC-GR, que translocam para dentro do núcleo e fazem a regulação gênica. A translocação do complexo para o núcleo possibilita a interação com uma região gênica denominada “elemento de resposta para os receptores de glicocorticóides” (GREs). Esta ligação inibe a expressão de fatores de transcrição nuclear pró-inflamatória como AP-1, NFAT, NF- κ B e STAT ou suprime a transcrição (transrepressão) de genes de proteínas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e IL-2. Além disso, a translocação nuclear do complexo GC-GR pode induzir a transcrição de genes de proteínas imunossupressoras, tais como a proteína inibidora do fator de transcrição nuclear Kappa B (I κ B), anexina-1, Interleucina 10 (IL-10), fosfatase-1 da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK fosfatase-1) e lipocortina-1 (LÖWENBERG et al., 2007).

Recentemente foi descrito que além das ações genômicas, os glicocorticóides também podem atuar por meio de mecanismos não-genômicos. Estes efeitos aparecem rapidamente (minutos), e parecem ser mediados por GR de membrana ou citosólico ou via interação não específica com a membrana celular. Pode ocorrer através de sinais de transdução desencadeados por receptores acoplados a proteínas G, associados a cascatas de segundos mensageiros que podem mobilizar o cálcio intracelular (LÖWENBERG et al., 2007).

Para a avaliação da potência anti-inflamatória e dos respectivos efeitos intracelulares de ação, normalmente são utilizadas técnicas de investigação anti-inflamatória *in vivo*, como edema de pata, peritonite

ou pleusiria induzidos por vários agentes flogísticos (CALIXTO et al., 2003), bem como protocolos de investigação *in vitro*, usando culturas celulares, como as linhagens de macrófagos murinos, RAW 269.7 (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; RASCHKE et al., 1978). Este método nos possibilita avaliar os principais mecanismos de sinalização celular envolvidos na transcrição de informações gênicas à vários estímulos inflamatórios.

10. DEFLAZACORTE E CARBAMAZEPINA

O deflazacorte (DFZ, Figura 4) é uma metiloxazolina derivada da prednisolona, de nome químico (11 β , 16 β)-21-(acetiloxi)11-hidroxi-2'-metil-5'H-pregna-1,4-dienol [17,16-d] oxazol-3,20-diona; 11b, 21-diidroxi-2-metil-5' β H preгна-1,4-dienol [17-16-d] oxazol-3,20-diona 21 acetato (O'NEIL, 2006). Apresenta fórmula molecular $C_{25}H_{31}NO_6$, com massa molecular de 441,52 u e faixa de fusão de 255 – 256,5 °C. Consiste de um pó cristalino branco ou amarelado, solúvel em metanol e etanol. Apresenta um coeficiente de partição (octanol/água) de 1,31 (GALICHET, 2006; SWEETMAN, 2007).

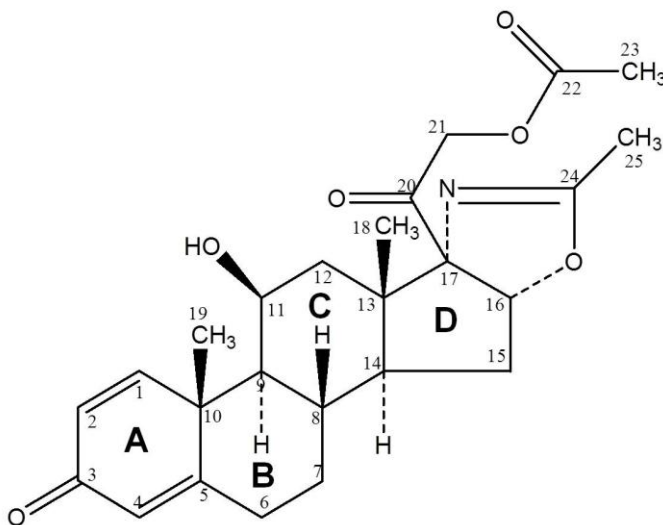


Figura 4: Estrutura química do Deflazacorte (SWEETMAN, 2007).

O DFZ é utilizado para o tratamento da artrite reumatóide, síndrome nefrótica, rejeição de transplantes de órgãos, artrite crônica juvenil, distrofia muscular progressiva entre outras (AZAD, 2009; JOSHI; RAJESHWARI, 2009). Possui biodisponibilidade de 68 % pela via oral, com uma taxa de ligação às proteínas plasmáticas de 40 %, e um tempo de meia vida que varia entre 1,9 a 2,3 h (GALICHET, 2006) e não apresenta polimorfos descritos na literatura. Tem demonstrado menos efeitos adversos quando comparado à prednisolona ou outros corticosteróides (ANGELINI, 2007; FERRARIS et al., 2007; LIPPUNER et al., 1998). Estudos de desenvolvimento e validação de método para a avaliação do perfil de dissolução para DFZ comprimidos 6 mg foram realizados por Sperandeo e Kassuha (2009). Estes autores demonstraram diferentes perfis de dissolução para produtos de diferentes fabricantes.

A CBZ (Figura 5) de nome químico 5H-Dibenz (b, f)azepina-5-carboxamida, fórmula molecular $C_{15}H_{12}N_2O$, peso molecular 236,27 u, ponto de fusão entre 187 e 193 °C. Consiste de um pó com características de branco a bege e praticamente insolúvel em água, solúvel em clorofórmio e metanol, ligeiramente solúvel em acetona e em etanol e muito pouco solúvel em éter etílico (BRASIL, 2010; GENNARO, 2004).

A CBZ é encontrada em diversas formas no estado sólido: cristais anidros, solvatos, cocrystal e sólido amorfo, entretanto geralmente é encontrada na forma anidra (CUFFINI et al., 2009). A CBZ anidra cristaliza em quatro polimorfos diferentes: triclinico (forma I), trigonal (forma II), P-monoclinica (forma III) e C-monoclinica (forma IV) (GRZESIAK et al., 2003).

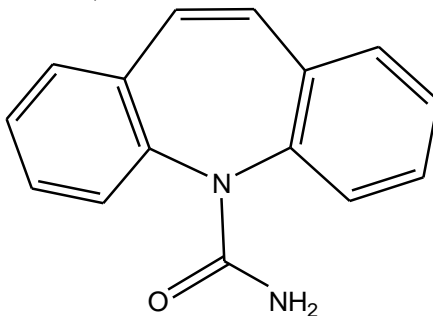


Figura 5: Estrutura química da carbamazepina (“Farmacopeia Brasileira,” 2010).

O DFZ e a CBZ são fármacos promissores para estudos na obtenção de cristais ocos através do método de antissolvente, visto que ambos apresentam baixa solubilidade em água e são solúveis em solventes orgânicos, como o metanol. O DFZ existe na forma micronizada e não micronizada e poucos estudos foram encontrados com relação à influência da cristalização e micronização no aumento da velocidade de dissolução. Visto que o processo de cristalização e as características do estado sólido tem um importante papel nas propriedades físicas, químicas e biofarmacêuticas do cristal (AALTONEN et al., 2009; MODI et al., 2013) é de extrema importância entender os mecanismos de formação dos cristais ocos e avaliar a estabilidade dos diferentes hábitos cristalinos encontrados para o DFZ, assim como estudar os efeitos biológicos que estes podem apresentar *in vivo* e *in vitro*.

**CAPÍTULO 2: ARTIGO 1 – HOLLOW CRYSTAL
ANTISOLVENT PREPARATION PROCESS AS A PROMISING
TECHNIQUE TO IMPROVE DISSOLUTION OF POORLY
SOLUBLE DRUGS**

APRESENTAÇÃO

Neste capítulo estão apresentados os resultados do estudo de um método de cristalização promissor para o aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, tais como a CBZ e o DFZ.

O método de cristalização por antissolvente foi utilizado com o objetivo de modificar as características morfológicas do cristal do deflazacorte (DFZ) e da carbamazepina (CBZ), levando à obtenção de cristais ocos e um aumento significativo da dissolução, quando comparado às matérias-primas encontradas no mercado. A CBZ é um fármaco modelo amplamente utilizado para diversos estudos na área farmacêutica. É um fármaco de baixa solubilidade e apresenta relatos de variabilidade no desempenho de dissolução em produtos comercializados no mercado farmacêutico, assim como o DFZ. Como foi encontrado na literatura relatos de cristais ocos de carbamazepina utilizando método de cristalização por evaporação com solventes orgânicos, e como este é um fármaco modelo para outros estudos, neste capítulo foram avaliadas cristalizações de CBZ e DFZ pelo método de cristalização do antissolvente, com o objetivo de obter hábito cristalino promissor no desempenho da dissolução. Os cristais obtidos foram caracterizados e avaliados quanto ao desempenho de dissolução.

O método pareceu muito promissor na obtenção de cristais ocos, além de ser de fácil execução e utilizar solventes de baixa toxicidade, como água e metanol.

Os resultados apresentados neste capítulo foram publicados no periódico *Journal of Crystal Growth*, 366 (2013) 76–81.

Hollow crystal antisolvent preparation process as a promising technique to improve dissolution of poorly soluble drugs

Paulino A.S.^a, Rauber G.S.^a, Campos C.E.M.^b, M.H.P. Maurício^d, R.R. de Avillez^d, Cuffini S.L.^{a,c}, Cardoso S.G.^a

^a Programa Pós-Graduação em Farmacia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

^c CONICET-CEPROCOR-MinCyT, Córdoba, Argentina

^d Departamento de Engenharia de Materiais, Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Corresponding Author: Silvia L. Cuffini and Simone G. Cardoso
Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Laboratório Controle de Qualidade. 88040-900 - Trindade – Florianópolis – SC, Brasil.

Fone: (55) 48-3721-5066

E-mail: scuffini@gmail.com

ABSTRACT

Innovative results using the anti-solvent preparation process to obtain hollow crystals of Deflazacort (DFZ) and Carbamazepine (CBZ) with improved dissolution characteristics are presented. DFZ is a methyloxazoline which is preferred over other corticosteroids due to its major advantages and performance. CBZ is a well-established drug for epilepsy treatment and exhibits at least four polymorphic forms and hydrate or solvate forms. Both drugs are poorly soluble in water and several strategies have been developed in order to find preparation methods to improve their dissolution rates. Moreover, reports have shown high dissolution variability in the tablets of DFZ and CBZ currently on the market. In this work, the hollow crystals of DFZ and CBZ were crystallized and characterized by scanning electron microscopy (SEM), X-ray powder diffraction (XRD), thermal analysis (DSC) and diffuse reflectance infrared Fourier (DRIFT) spectroscopy. DFZ showed prismatic hollow crystals with the same crystal structure of the raw material. The morphology of crystallized samples of CBZ showed the same shape; however, the raw material was a monoclinic form (polymorph III) while hollow crystals presented triclinic crystal structure (polymorph I). Finally, in both cases, the hollow crystals of CBZ and DFZ significantly improved the dissolution properties in comparison with the initial raw materials. Innovative results using the anti-solvent preparation process to obtain hollow crystals of Deflazacort (DFZ) and Carbamazepine (CBZ) with improved dissolution characteristics are presented. DFZ is a methyloxazoline which is preferred over other corticosteroids due to its major advantages and performance. CBZ is a well-established drug to treat epilepsy and exhibits at least four polymorphic forms and hydrate or solvate forms. Both drugs are poorly soluble in water and several strategies have been developed in order to find ways to improve their dissolution rates. Moreover, reports have shown high dissolution variability in the tablets of DFZ and CBZ currently on the market. The hollow crystals obtained were characterized by scanning electron microscopy (SEM), X-ray powder diffraction (XRD), thermal analysis (DSC) and diffuse reflectance infrared Fourier (DRIFT) spectroscopy. DFZ showed hollow tubular crystals with the same crystal structure of the raw material. The morphology of CBZ showed tubular shape and hollow crystals. The crystal structure of CBZ raw material was a monoclinic form (polymorph III) while hollow crystal was crystallized as a triclinic crystal structure (polymorph I). The obtained hollow crystals of CBZ

and DFZ, modified the crystal habits and surface area and, as a consequence, significantly improved their dissolution properties.

Keywords:

Characterization. Crystal morphology, Crystal structure. X-ray diffraction. Growth from solutions.

1. INTRODUCTION

The Biopharmaceutical Classification System (BCS) classifies drugs in class I, II, III or IV according to the solubility and permeability. It has been reported that approximately 40% of drugs are classified in the Class II (low solubility–high permeability), and the Class IV (low solubility–low permeability) category (KAWABATA et al., 2011). The bioavailability of these categories of drugs (II and IV classes) is limited due to their low solubility and dissolution rate. The majority of currently marketed drugs is highly lipophilic and therefore has low solubility in water. At present, the poor aqueous solubility drugs are a great challenge in formulation processes (FAHR; LIU, 2007). Therefore, the enhancement of dissolution rates is one of the most important parameters, which should be considered as a specific characteristic of raw materials during the formulation development of orally administered drugs (THOMAS et al., 2006). A large amount of research has been carried out to find ways to increase the solubility of poorly soluble drugs and their dissolution profiles and consequently to improve the absorption and bioavailability of the drug (KAWABATA et al., 2011; PATIL et al., 2011).

Carbamazepine (CBZ) and Deflazacort (DFZ) are anhydrous and poorly soluble drugs. DFZ and CBZ products present a history of irregular drug performance and reports showed high dissolution variability in DFZ and CBZ tablets on the market (SEHIĆ et al., 2010; SPERANDEO, 2009). Dissolution is an official test used by pharmacopeias for evaluating drug release of solid, semisolid dosage forms, powders and others and it is used in quality control or research. Therefore, the studies and the focus on dissolution testing in research are important to provide some predictive estimates of the drug release in respect to the in vivo performance of a drug product (AZARMI et al., 2007).

On the other hand, crystallization is the final process in the preparation of a solid state active pharmaceutical ingredient (API) in the pharmaceutical industry. In addition to that, during this process the physicochemical properties, stability and drug release properties of the final dosage forms are determined (GARCIA et al., 1999). The crystallization process defines chemical purity and physical properties such as polymorphism, crystalline habits, particle size and the level of crystal imperfections. In poorly soluble drugs, the control of these

parameters is critical since they could modify the physical and chemical properties of the solid drug, and affect the dissolution profile (CHEN et al., 2011; GARCIA et al., 1999), and as a consequence the therapeutic effects.

The basic principle of anti-solvent crystallization techniques is that the drug is dissolved in a solvent; the solvent solution is then mixed with an anti-solvent (in which the drug is insoluble). The drug precipitates because of the change of supersaturation caused by mixing the solution and the anti-solvent (VIÇOSA et al., 2012). This technique presents some advantages for the industry; it is a straightforward method, it is fast and it is possible to carry this process out using green solvents for pharmaceutical crystallization. In addition, the anti-solvent precipitation process is a promising technique to prepare ultrafine drug particles, thus obtaining a reduced particle size and an increase in surface area (CHO et al., 2010; DONG et al., 2009; VIÇOSA et al., 2012; WANG et al., 2007); it has been used to precipitate nano/micro particles of various APIs (THORAT; DALVI, 2012).

Hollow crystals of some organic compounds have been reported in literature (COHEN et al., 1950; EDDLESTON; JONES, 2010; MALLET et al., 2004; MANISH et al., 2005; MARTINS et al., 2011), and the anti-solvent method is used for obtaining hollow crystals from hydrates and solvates. Crystalline organic solvates are immersed in anti-solvent and it induces phase transformation to a solid free of solvent, leading to hollow crystal formation. This phenomenon has been observed in several substances, showing the relevance to obtain hollow crystals of drugs since the surface area increases causing an increase of the dissolution rates. In fact, the literature review showed that the hollow crystals have been studied, leading to a considerable attention to their properties, including the larger surface area (DETTE et al., 2007; DETTE, S. S. et al., 2010; DETTE, S.S. et al., 2010). However, the mechanism is not completely clear for the whole of pharmaceutical cases and more investigations and evidence are necessary.

The aim of this work was to study the pharmaceutical hollow crystals of CBZ and DFZ prepared using the anti-solvent crystallization process with specific operational conditions. In addition to that, the hollow crystal and commercial raw material samples of the drugs were characterized and compared their dissolution profiles in order to evaluate the advantages and relevance of the crystal morphology for the pharmaceutical applications.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. MATERIALS

DFZ was purchase from Taizhou TaAPI Pharma Co., Ltd lot 5190-1008002, expiration date 08/2013. CBZ was donated by Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, lot 06266/2008, expiration date 03/2013.

2.2. CRYSTALLIZATION PROCESS

Sample solutions were prepared by dissolving appropriate amounts of Carbamazepine raw material (CBZ-RM) or Deflazacort raw material (DFZ-RM) in methanol (25 mg mL⁻¹) and heating at 65°C. Further, different amounts of water were immediately added over hot solution. The proportion of methanol:water were 1:1; 1:2; 1:3; 1:5 and 1:6 (v/v). At room temperature, the crystallization process was stopped after 4 and 60 min with filtration. Crystallized samples were retained in quantitative filter (pore size 28 mm) and the samples were oven dried at 40 °C. The crystalline samples of CBZ and DFZ obtained were denominated CBZ-C and DFZ-C, respectively.

2.3. SOLID STATE CHARACTERIZATION

2.3.1 Scanning Electron Microscopy (SEM)

The morphologies of CBZ-C and DFZ-C were determined by scanning electron microscopy. SEM images were taken using a JEOL JSM-6390LV Scanning Electron Microscope. Samples were mounted with carbon adhesive on aluminum holder, sputtered with gold and photographed at a voltage of 10 kV (CBZ) and 15 kV (DFZ).

2.3.2. Particle size determination

The particle size distributions were carried out by optical microscopy using an Axio Imager M2m, with an AxioCam MRc5 digital camera and AxioVision v4.7 software to capture and analyze the images (Carl Zeiss) and scanning electron microscopy using a Jeol DJSM 6510LV microscope. Pictures were taken from different areas of the samples until 90 particles were considered.

2.3.3. Ray Powder Diffraction (XRPD)

X-ray diffraction patterns were collected from a PANalytical X'PERT Multipurpose diffractometer equipped with a Cu K α source ($\lambda=1.5418^\circ\text{\AA}$) operated at 45 kV and 40 mA and angular scanning speed 2°min^{-1} . The specific conditions for DFZ were between 5° and $40^\circ 2\theta$, with step size 0.033° , 10 s per step and for CBZ 5° to $60^\circ 2\theta$, with a step size $0.016^\circ 2\theta$, a counting time of 30 s per step. The cif files of Cambridge Structure Data (CSD) CBMZPN01, CBMZPN11 and YEYYAD were used as reference material for polymorphic identification.

2.3.4. Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC experiments were carried out with a Shimadzu DSC-60 calorimeter (Kyoto, Japan). The samples ($\sim 2\text{mg}$) were weighed in an aluminum pan and scanned from 25 to 500°C at heating rate of $10^\circ\text{C min}^{-1}$ under dynamic N_2 atmosphere of 50 mL min^{-1} .

2.3.5. Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transformed Spectroscopy (DRIFT)

DRIFT experiments were performed with a Shimadzu spectrometer, over a range of $3800\text{--}500\text{ cm}^{-1}$, using KBr 1% (w/w).

2.4 DISSOLUTION PROFILE

Dissolution profiles were conducted using an equipment Varian (Vankel 7000), USP dissolution apparatus II (paddle) and purified water as a dissolution media at temperature of $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. CBZ-RM or crystallized samples were accurately weight (100 mg) or DFZ-RM or crystallized sample (30 mg) added in the vessel containing 500 mL of dissolution medium under agitation rate at 50 rpm. Aliquots of dissolution medium (10 ml) were withdrawn at specific intervals of time, filtered and analyzed. The volumes withdrawn at each time interval were replaced with fresh quantity of the dissolution medium. CBZ samples were assayed spectrophotometrically at wavelength of 285 nm to evaluate the amounts of drug dissolved. DFZ samples were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) on a Shimadzu system (Shimadzu, Kyoto, Japan) composed of a LC-10

ADVP pump, a SCL-10 AVP system controller, a SIL-10 ADVP auto-injector and a degasser module. Data were acquired and processed by the Shimadzu CLASS-VP 5.032 software (Shimadzu, Kyoto, Japan). A C18 (250 x 4.6 mm, i.d., 4 μ m particle size) column was used (Luna Phenomenex, Torrance, CA - USA). The mobile phase consisted of acetonitrile:water (80:20, v/v), applied at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The injection volume was 20 μ L and the detection wavelength was 244 nm (SCREMIN et al., 2010). The dissolution assay was evaluated in triplicate.

2.5. DISSOLUTION EFFICIENCY

Percent dissolution efficiency (% DE) is defined as the area under the dissolution curve (AUC_{0-120}) up to a certain time, t , expressed as a percentage of the area of the rectangle described (AUC_{TR}) by 100% dissolution in the same time (COSTA; SOUSA LOBO, 2001). DE was calculated by formula described below:

$$DE = \frac{AUC_{(0-120)}}{AUC_{TR}} \times 100$$

It was calculated to compare the relative performance of the raw material and hollow crystal of CBZ or DFZ. Results were expressed as mean values \pm SD. Statistical comparisons were made by Student's t-test of comparison. $P < 0.05$ was considered to be significant by means of GRAPH PAD PRISM INSTANT Program (San Diego, CA, USA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 CRYSTALLIZATION PROCESS

Antisolvent crystallization of CBZ and DFZ was carried out with different proportions of solvent-antisolvent (methanol:water) and different standing times (4 and 60 minutes). In both drugs, crystals were obtained immediately after the addition of antisolvent (water). The crystals were filtered and dried at 40 °C for complete characterization.

3.2 SOLID STATE CHARACTERIZATION

Scanning electron microscopic photographs of crystallized CBZ are shown in Figure 1 and hollow crystals were observed, using the antisolvent method under all conditions. Crystals presented a prismatic habits (tubular shape), with channels and whiskers on the surface (see Figure 1A and C). Crystallization time was an important factor which was controlled. Morphological differences were found between crystals obtained in times of 4 and 60 min. This is shown in Figure 1C (4 min) and Figure 1A (60 min). As was expected, crystals obtained at the time of 60 min presented more regular form, while the ones obtained at 4 min were smaller and more irregular.

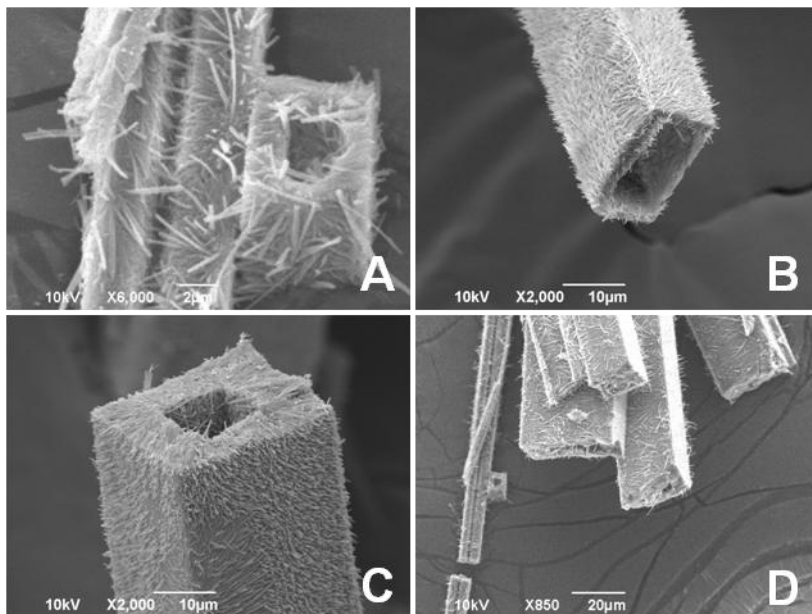


Figure 1: Scanning Electron Microscopic Photographs of crystallized sample of CBZ.

Figure 2 shows SEM images of crystallized samples of DFZ. All crystallization conditions, the particles presented also a prismatic shape with channels, free from irregularities, pores or whiskers. These hollow crystals had well-defined faces and the channels could be visualized along the crystal as shown in Figure 1C. The hollow crystal of DFZ had a length of $561 \pm 132 \mu\text{m}$ and hollow face of $30 \pm 9 \mu\text{m}$ while CBZ shown the same morphology with a length of $319 \pm 202 \mu\text{m}$ and hollow face of $34 \pm 12 \mu\text{m}$.

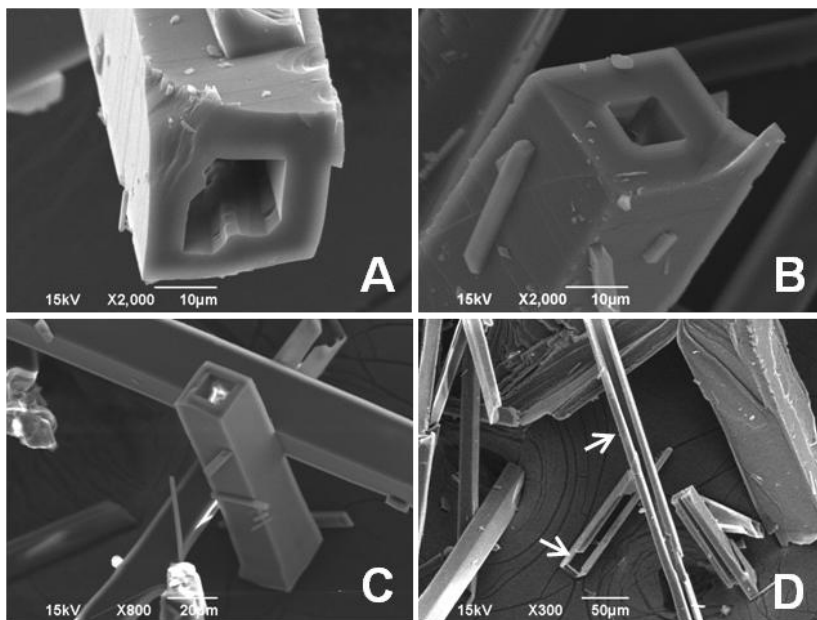


Figure 2: Scanning Electron Microscopic Photographs of crystallized sample of DFZ. (The channels are indicated by an arrow).

X-ray diffraction patterns of CBZ samples are shown in Figure 3. CBZ-RM (Figure 3A) presented the characteristic peaks reported for CBZ polymorph III (p-monoclinic) while CBZ-C (Figure 3B) reflections corresponded to the crystal structure reported for polymorph I (triclinic) [25,26]. According to Grzesiak et al. (GRZESIAK et al., 2003), the peaks at $2\theta=7.92$; 9.37 ; 12.28 and 19.99 were identified for Carbamazepine form I, while form III could be observed at $2\theta=15.36$; 19.56 ; 25.0 and 27.47 .

The X-ray diffraction patterns of DFZ-RM and DFZ-C are shown in Figure 3C and D, respectively. In this case, both samples were identified with the same crystalline structure. Although DFZ-C presented preferred orientation in the following planes: $(0,1,1)$, $(1,2,0)$ and $(0,1,3)$.

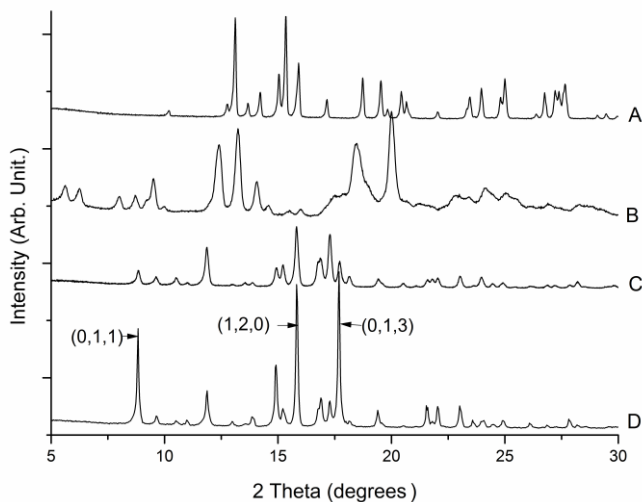


Figure 3: X-Ray Diffraction of CBZ-RM (A); CBZ-C (B); DFZ-RM (C); DFZ-C (D).

Differential Scanning Calorimetry (DSC) was used for characterization of crystallized samples of CBZ and DFZ, as shown in Figure 4 and Table 1. DSC curve of CBZ-RM (Figure 4A) showed two endothermic and one exothermic event. The first event occurred at 173.53 °C appearing immediately after an exothermic event. The second endothermic event appeared at 191.07 °C. Data reported in literature showed that the first endothermic event on the DSC curve corresponds to the melting of form III, the exothermic event shows the crystallization of form I, and the second endothermic peak coincides with the melting of form I (GRZESIAK et al., 2003; RUSTICHELLI et al., 2000; SEHIĆ et al., 2010). However, for CBZ-C (Figure 4B) only one event was observed, at 190.22 °C, related to the melting point of Form I. The crystallization process of CBZ by the anti-solvent method made possible to obtain hollow crystals, changing the crystal structure or polymorph of the initial raw material. The DSC curve of DFZ-RM (Figure 4C) and DFZ-C (Figure 4D) showed one thermal event at 255.7 °C and 256.87 °C, respectively. Other exothermic events that appeared after the melting point were due to the degradation process. These results were in agreement with the crystal structure data of DFZ reported by Cuffini et

al. (CUFFINI et al., 2007). In the case of DFZ, the crystallization anti-solvent method, allowed us to modify the crystal habits without changing in the crystalline structure.

Table 1: Thermal analyses of CBZ-RM, CBZ-C, DFZ-RM and DFZ-C samples.

| Sample | T_{peak} DSC/°C | T_{onset} DSC/°C | T_{endset} DSC/°C | ΔH J g⁻¹ |
|---------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| CBZ-RM | 173.53 | 170.71 | 188.19 | -13.56 |
| (form III) | 191.07 | 174.84 | 193.71 | -105.68 |
| CBZ-C | 190.22 | 188.46 | 193.5 | -119.57 |
| (form I) | | | | |
| DFZ-RM | 255.7 | 253.24 | 258.16 | -73.97 |
| DFZ-C | 256.87 | 255.33 | 259.40 | -84.11 |

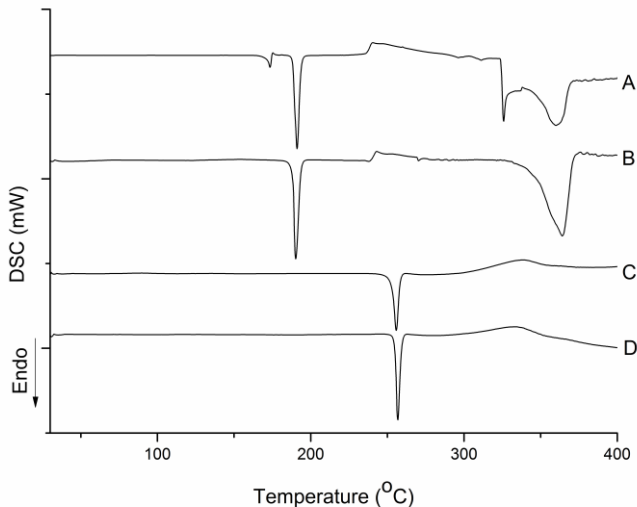


Figure 4: Differential Scanning Calorimetry (DSC) of CBZ-RM (A); CBZ-C (B); DFZ-RM (C); DFZ-C (D) in dynamic nitrogen atmosphere (50 mL min⁻¹) and heating rate of 10 °C min⁻¹.

DRIFT is the most suitable technique of the non-destructive spectroscopic methods and has become an attractive method in the analysis of solids, since the materials are not subject to thermal or mechanical energy during sample preparation, therefore, preventing solid-state transformations (STEPHENSON et al., 2001). The three main areas for identifying and distinguishing the polymorphs of CBZ are 3500–3392, 1731–1629, and 1427–1317 cm^{-1} (GRZESIAK et al., 2003). Spectra of CBZ-RM (Figure 5A) showed the three main absorptions in 3469, 1676 and 1385 cm^{-1} , while in CBZ-C (Figure 5B) these absorptions appear at 3488, 1688 and 1398 cm^{-1} . Results of CBZ-RM are in agreement with those reported in literature for Form III, while CBZ-C is, according to data, related to Form I. The above values are in agreement with those reported in the literature (GRZESIAK et al, 2003).

Spectra of DFZ-RM and DFZ-C are shown in Figure 5C and D, respectively. The four main regions for identifying DFZ are at 1749, 1730 and 1652 cm^{-1} , referring to carbonyl groups and the characteristic band corresponding to the stretch vibration of the OH which appeared as a broad band centered at 3460 cm^{-1} (CUFFINI et al., 2007).

According to the thermal and spectroscopic characterization by DSC and DRIFT of the hollow crystals, the results were in agreement with the crystal structure identified by XRPD.

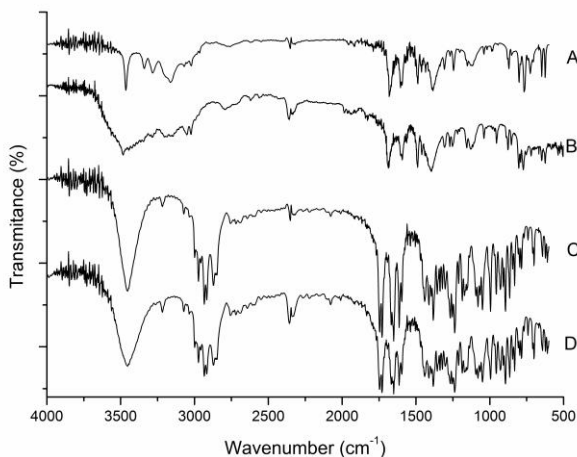


Figure 5: Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transformed Spectroscopy of CBZ-RM (A) ; CBZ-C (B); DFZ-RM (C); DFZ-C (D).

3.3 DISSOLUTION STUDIES

Hollow crystals were evaluated by dissolution studies and were compared with the raw materials (Figure 6). Statistical analysis demonstrated that the profiles were significantly different. The results showed that approximately 75% of CBZ-C was dissolved after 20 min, while only 27% of CBZ-RM was dissolved at the same time and conditions (Figure 6A). It was clear that the dissolution profile of this drug was improved by the characteristics of hollow crystal samples. CBZ-RM and CBZ-C presented different polymorphs and this may also affect their dissolution profile; Kobayashi et al. reported the intrinsic dissolution rate (IDR) and dissolution profile form I and III (KOBAYASHI et al., 2000). They demonstrated that IDR of form III was higher than form I. Therefore, taking into account only the polymorphism contribution, it would be expected that dissolution performance of the raw material would have been higher than that of the hollow crystals. However, the hollow crystals showed significant improvement of the dissolution profile for less soluble polymorph of CBZ, form I. Dissolution profiles of DFZ are shown in Figure 6B. At 20 min, only 4% of DFZ-RM was dissolved, while at the same time and conditions nearly 26.5% of DFZ-C was dissolved.

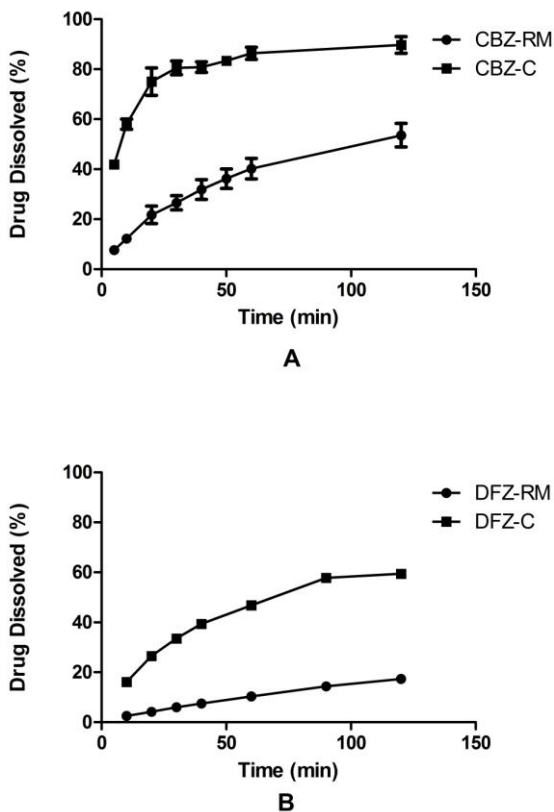


Figure 6: Dissolution profile of raw material and hollow crystal: CBZ (A); DFZ (B).

Raw material and hollow crystals were compared by dissolution efficiency (DE), which is related to the real amount of drug dissolved in the dissolution medium. The values are shown in Table 2 and the statistical analysis was performed by Student's t-test comparison. P values less than 0.05 ($P < 0.05$) were considered as indicative of significance. Hollow crystals of CBZ and DFZ presented an increase of dissolution efficiency of 19.8% and 27.43%, respectively. Therefore, the dissolution efficiency of hollow crystals is significantly greater than the raw materials. At present, the pharmaceutical industries use the micronization as standard method in order to decrease the particle sizes and, as a consequence, increase the dissolution rate of the poorly soluble drugs. Although, the sizes of the hollow crystals were significantly

larger in comparison with the typical particle size of micronized raw material (3–5 μm), also the dissolution increased. Therefore, our results showed that the dissolution properties were improved using the hollow crystals of CBZ and DFZ mainly due to the morphology of crystals, despite of the particle sizes were larger.

Table 2: Average of efficiency dissolution of raw materials and hollow crystals of CBZ and DFZ with a confidence interval of 95%.

| | CBZ (% \pm SD) | DFZ (% \pm SD) |
|----------------|------------------|-------------------|
| Raw material | 65.85 \pm 0.88 | 57.50 \pm 0.80 |
| Hollow Crystal | 85.67 \pm 2.38 | 84.93 \pm 0.12 |

4. CONCLUSION

The anti-solvent crystallization method made it possible to obtain hollow crystals from anhydrous and poorly soluble drugs in specific conditions. We obtained hollow crystal habits of CBZ and DFZ; crystallized with the same and different crystal structures of the initial raw material. In this study, the dissolution performance and dissolution efficiency significantly increased using hollow crystals in comparison with the initial raw materials. These results demonstrated the relevance of the design and control the polymorphism and also the morphology of APIs during the crystallization process. In addition to that, the dissolution rate could be modified not only decreasing the particle sizes but also with adequate polymorphism and crystal habit crystallization. Finally, the anti-solvent crystallization process with specific operational conditions is a promising strategy for solid APIs preparation in order to improve the dissolution properties and, as a consequence, the bioavailability of poorly soluble drugs.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors want to thank Laboratório de Difração de Raio-X (LDRX) and Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) at UFSC, CNPq, CAPES, FAPESC, CLAF, Fundación Sauberman and CONICET for student fellowships and financial support. Silvia L. Cuffini thanks CAPES for Visited Professor and CONICET, Argentina fellowships. Thanks are given also to the Consejo Superior de Investigaciones

Científicas (CSIC) of Spain for the award of a license for the use of the CSD.

REFERENCES

- AZARMI, S.; ROA, W.; LÖBENBERG, R. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, n. 1, p. 12–21, 2 jan 2007.
- CHEN, J.; SARMA, B.; EVANS, J. M. B.; MYERSON, A. S. Pharmaceutical Crystallization Published as part of the Crystal Growth & Design 10th Anniversary Perspective. **Crystal Growth & Design**, v. 11, p. 887–895, 2011.
- CHO, E.; CHO, W.; CHA, K.-H.; PARK, J.; KIM, M.-S.; KIM, J.-S.; PARK, H.J.; HWANG, S.-J. Enhanced dissolution of megestrol acetate microcrystals prepared by antisolvent precipitation process using hydrophilic additives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 396, n. 1-2, p. 91–8, 30 ago 2010.
- COHEN, J.; HENRY, R. A.; SKOLNIK, S. Hollow Crystals of Nitroguanidine Vacuum Differential Thermal Analysis. **Science**, v. 111, p. 278–279, 1950.
- COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123–33, maio 2001.
- CUFFINI, S.L.; ELLENA, J.F.; MASCARENHAS, Y.P.; AYALA, A.P.; SIELSER, H.W.; FILHO, J.M.; MONTI, G. A.; AIASSA, V.; SPERANDEO, N.R. Physicochemical characterization of deflazacort: thermal analysis, crystallographic and spectroscopic study. **Steroids**, v. 72, n. 3, p. 261–9, mar 2007.
- DETTE, S. S.; STELZER, T.; JONES, M. J.; COQUEREL, G.; ULRICH, J. Fascinating control of crystalline microstructures. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 88, n. 9, p. 1158–1162, set 2010.

DETTE, S. S.; STELZER, T.; JONES, M. J.; ULRICH, J. Dehydration behaviour of hydrates. **Crystal Research and Technology**, v. 45, n. 7, p. 697–702, 23 abr 2010.

DETTE, S. S.; STELZER, T.; RO, E.; JONES, M. J.; ULRICH, J. Controlling the Internal Diameter of Nanotubes by Changing the Concentration of the Antisolvent 2007. **Crystal Growth & Design**, v. 7, p. 7–9, 2007.

DONG, Y.; NG, W. K.; SHEN, S.; KIM, S.; TAN, R. B. H. Preparation and characterization of spironolactone nanoparticles by antisolvent precipitation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 375, n. 1-2, p. 84–8, 22 jun 2009.

EDDLESTON, M. D.; JONES, W. Formation of Tubular Crystals of Pharmaceutical Compounds. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 1, p. 365–370, 6 jan 2010.

FAHR, A.; LIU, X. Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 4, n. 4, p. 403–16, jul 2007.

GARCIA, E.; BOISTELLE, R.; HOFF, C. Crystallization and dissolution of pharmaceutical compounds An experimental approach. **Journal of Crystal Growth**, v. 199, p. 1360–1364, 1999.

GRZESIAK, A. L.; LANG, M.; KIM, K.; MATZGER, A. J. Comparison of the four anhydrous polymorphs of carbamazepine and the crystal structure of form I. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 11, p. 2260–71, nov 2003.

KAWABATA, Y.; WADA, K.; NAKATANI, M.; YAMADA, S.; ONOUE, S. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 1–10, 25 nov 2011.

KOBAYASHI, Y.; ITO, S.; ITAI, S.; YAMAMOTO, K. Physicochemical properties and bioavailability of carbamazepine

polymorphs and dihydrate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 193, p. 137–146, 2000.

MALLET, F.; PETIT, S.; LAFONT, S.; BILLOT, P.; LEMARCHAND, D.; COQUEREL, G. Crystal Growth Mechanism in a Solution of Hollow Whiskers of Molecular Compounds. **Crystal Growth & Design**, v. 4, n. 5, p. 965–969, 2004.

MANISH, M.; HARSHAL, J.; ANANT, P. Melt sonocrystallization of ibuprofen: effect on crystal properties. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, n. 1, p. 41–8, maio 2005.

MARTINS, D.; STELZER, T.; ULRICH, J. Formation of Crystalline Hollow Whiskers as Relics of Organic Dissipative Structures b b. **Crystal Growth & Design**, v. 11, p. 3020–3026, 2011.

PATIL, S. K.; WAGH, K. S.; PARIK, V. B.; AKARTE, A. M.; BAVISKAR, D. T. Strategies for solubility enhancement of poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 8, n. 2, p. 74–80, 2011.

RUSTICHELLI, C.; GAMBERINI, G.; FERIOLI, V.; GAMBERINI, M.C.; FICARRA, R.; TOMMASINI, S. Solid-state study of polymorphic drugs: carbamazepine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, n. 1, p. 41–54, ago 2000.

SCREMIN, A.; PIAZZON, M.; SILVA, M.A.S.; KUMINEK, G.; CORREA, G.M.; PAULINO, N.; CARDOSO, S.G. Spectrophotometric and HPLC determination of deflazacort in pharmaceutical dosage forms. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, p. 281–287, jun 2010.

SEHIĆ, S.; BETZ, G.; HADZIDEDIĆ, S.; EL-ARINI, S. K.; LEUENBERGER, H. Investigation of intrinsic dissolution behavior of different carbamazepine samples. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 386, n. 1-2, p. 77–90, fev 2010.

SPERANDEO, N. R. Development and Validation of a Dissolution Test for 6 mg Deflazacort Tablets. **Scientia Pharmaceutica**, v. 77, n. 3, p. 679–693, 2009.

STEPHENSON, G. A.; FORBES, R. A.; REUTZEL-EDENS, S. M. Characterization of the solid state: quantitative issues. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 67–90, 16 maio 2001.

THOMAS, V.H.; BHATTACHAR, S.; HITCHINGHAM, L.; ZOCHARSKI, P.; NAATH, M.; SURENDRAN, N.; STONER, C.L.; EL-KATTAN, A. The road map to oral bioavailability: an industrial perspective. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 2, n. 4, p. 591–608, ago 2006.

THORAT, A. A.; DALVI, S. V. Liquid antisolvent precipitation and stabilization of nanoparticles of poorly water soluble drugs in aqueous suspensions: Recent developments and future perspective. **Chemical Engineering Journal**, v. 181-182, p. 1–34, fev 2012.

VIÇOSA, A.; LETOURNEAU, J.-J.; ESPITALIER, F.; INÊS RÉ, M. An innovative antisolvent precipitation process as a promising technique to prepare ultrafine rifampicin particles. **Journal of Crystal Growth**, v. 342, n. 1, p. 80–87, mar 2012.

WANG, Z.; CHEN, J.-F.; LE, Y.; SHEN, Z.-G.; YUN, J. Preparation of Ultrafine Beclomethasone Dipropionate Drug Powder by Antisolvent Precipitation. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, n. 14, p. 4839–4845, jul 2007.

**CAPÍTULO 3: ARTIGO 2 – DISSOLUTION
ENHANCEMENT OF DEFLAZACORT USING
HOLLOW CRYSTALS PREPARED BY ANTISOLVENT
CRYSTALLIZATION PROCESS**

APRESENTAÇÃO

Fármacos pouco solúveis em água apresentam problemas com relação à biodisponibilidade. Técnicas para melhorar este parâmetro são frequentemente pesquisadas. A micronização é um processo bastante utilizado, pois reduz o tamanho da partícula, aumenta a área superficial, podendo melhorar a solubilidade. Apesar de ser um método eficiente na redução do tamanho de partícula, o processo mecânico utilizado pode levar a alterações estruturais e superficiais do cristal, conforme demonstrado para alguns fármacos na literatura, interferindo assim em características tais como fluidez e molhabilidade.

A cristalização é um processo importante na obtenção de fármacos na indústria farmacêutica e diversas técnicas são empregadas. A cristalização através do método por antissolvente é um processo simples e rápido, no entanto as condições de cristalização interferem no tamanho do cristal, forma e estrutura cristalina, afetando diretamente as propriedades físico-químicas do fármaco, principalmente a solubilidade.

Em função de fatores como cristalização e processo de micronização torna-se necessário uma adequada caracterização do estado sólido, com o objetivo de investigar que alterações podem ocorrer durante estes processos, quais suas vantagens e desvantagens.

O DFZ está disponível no mercado brasileiro na forma micronizada e não micronizada. É um fármaco de baixa solubilidade e estudos com relação ao efeito da micronização e da influência do processo de cristalização através do método antissolvente não foram encontrados na literatura.

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos utilizando processos de cristalização pelo método de antissolvente para o DFZ com o objetivo de obter cristais ocós, avaliando as melhores condições para obtenção destes. Os cristais obtidos foram comparados quanto às características físico-químicas e correlacionados ao perfil de dissolução de matérias-primas comercializadas na forma micronizada e não micronizada. Os resultados apresentados neste capítulo foram publicados na *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49 (2013) 294–301.

DISSOLUTION ENHANCEMENT OF DEFLAZACORT USING HOLLOW CRYSTALS PREPARED BY ANTISOLVENT CRYSTALLIZATION PROCESS

Paulino A.S.^a, Rauber, G.^a, Campos C.E.M.^b, Maurício M.H.P.^d, de Avillez R. R.^d, Capobianco G.^e, Cardoso S.G.^a Cuffini S.L.^{a,c*}

^a Programa Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, (Florianópolis-Brasil)

^b Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal de Santa Catarina, (Florianópolis-Brasil)

^c CONICET-CEPROCOR – MinCyT. Córdoba, Argentina

^d Departamento de Engenharia de Materiais, Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, (RJ-Brasil).

^e Departamento de Pós-Graduação de Engenharia de Materiais, Universidade Estadual de Ponta Grossa, (PR-Brasil).

Corresponding Author: Amarilis Scremin Paulino, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Laboratório Controle de Qualidade. 88040-900 - Trindade – Florianópolis – SC, Brasil.

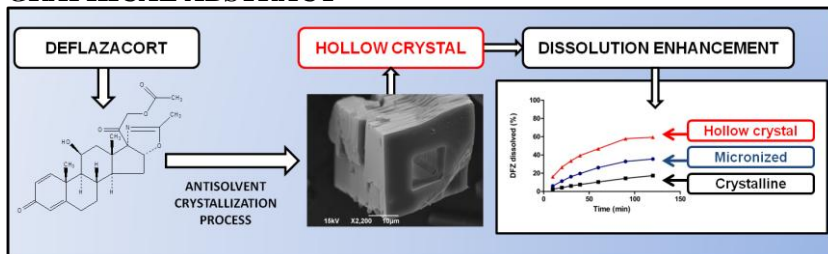
Fone: (55) 48-3721-5066

E-mail: amarilis_paulino@yahoo.com.br

ABSTRACT

Deflazacort (DFZ), a derivate of prednisolone, is a poorly soluble drug which has been proposed to have major advantages over other corticosteroids. Poorly soluble drugs present limited bioavailability due to their low solubility and dissolution rate and several strategies have been developed in order to find ways to improve them. In general, pharmaceutical laboratories use a micronized process to reduce the particle size in order to increase the dissolution of the drugs. However, this process causes changes such as polymorphic transitions, particle agglomeration and a reduction in fluidity and wettability. These solid-state properties affect the dissolution behaviour and stability performance of drugs. Crystallization techniques are widely used in the pharmaceutical industry and antisolvent crystallization has been used to obtain ultrafine particles. In this study, DFZ was investigated in terms of its antisolvent crystallization in different solvents and under various preparation conditions (methanol/water ratio, stirring and evaporation rate, etc.), in order to compare the physicochemical properties between crystallized samples and raw materials available on the Brazilian market with and without micronization. Crystalline structure, morphology, and particle size, and their correlation with the Intrinsic Dissolution Rate (IDR) and dissolution profile as relevant biopharmaceutical properties were studied. Crystallization conditions were achieved which provided crystalline samples of hollow-shaped crystals with internal channels, which increased the dissolution rate of DFZ. The antisolvent crystallization process allowed the formation of hollow crystals, which demonstrated a better dissolution profile than the raw material (crystalline and micronized), making this a promising technique as a crystallization strategy for improving the dissolution and thus the bioavailability of poorly soluble drugs.

GRAPHICAL ABSTRACT



1. INTRODUCTION

Deflazacort (DFZ) (Figure 4A) is a poorly soluble drug derived from prednisolone and it has been proposed that it may have major advantages over other corticosteroids (JOSHI AND RAJESHWARI, 2009). The *in vitro* release profiles of DFZ tablets produced by two different laboratories were shown to be significantly different, indicating that the two products are not equivalent in terms of their dissolution behavior (SPERANDEO AND KASSUHA, 2009).

A critical problem associated with poorly soluble drugs is their low and variable bioavailability derived from their slow dissolution and erratic absorption. Various approaches have been developed with a focus on enhancing the solubility, dissolution rate, and oral bioavailability of poorly water-soluble drugs (KAWABATA ET AL., 2011; PATIL ET AL., 2011). In general, pharmaceutical laboratories use the micronization process to reduce the particle size in order to increase the dissolution rate of drugs (CHAUMEIL, 1998; KESISOGLOU ET AL., 2007). However, this mechanical process may cause changes such as polymorphic transitions, particle agglomeration, statically charged particles and decreased fluidity and wettability (PASQUALI ET AL., 2006), which do not necessarily improve the dissolution of drugs.

Crystallization is an important process employed to produce a wide variety of materials in the pharmaceutical industry. The control of the crystal size and shape and polymorphism is crucial as these factors can influence the physical and chemical properties of the solid including the dissolution rate and solubility (CHEN ET AL., 2011; GARCIA ET AL., 1999). Several crystallization techniques are widely used in the pharmaceutical industry and antisolvent crystallization is one of them. The basic principle is that the drug is dissolved in a solvent; the solvent solution is then mixed with an antisolvent (in which the drug is insoluble). Precipitation occurs as a consequence of the altered supersaturation level caused by mixing the solution with the antisolvent (VIÇOSA ET AL., 2012). The technique presents some advantages, involving a straightforward method which is rapid and easy to perform. This is a promising technique to prepare ultrafine drug particles which can increase the dissolution rate and improve the bioavailability (DONG ET AL., 2009; WANG ET AL., 2007). Studies have shown that antisolvent precipitation under mild conditions can be applied as a simple and useful technique to prepare poorly water-soluble drug

particles with a reduction in particle size, a narrow particle size distribution and enhanced dissolution properties (CHO ET AL., 2010).

A literature review showed that interest in hollow crystals has been increasing in several technical areas based on their properties. Research with hollow crystals has been performed with organic (COHEN ET AL., 1950; EDDLESTON AND JONES, 2010; MALLET ET AL., 2004; MANISH ET AL., 2005; MARTINS ET AL., 2011) and inorganic (DETTE ET AL., 2010A, 2010B; DETTE ET AL., 2007; NIWA ET AL., 2010; SCHUSTER ET AL., 2011; WACHSMUTH ET AL., 2011; YANG ET AL., 2010) compounds, leading to considerable attention being focused on their properties, which include low bulk density and specific surface area. However, in the pharmaceutical area hollow crystal still are poorly explored. The antisolvent method has been used to produce hollow crystals of dexamethasone acetate monohydrate (MALLET ET AL., 2004); however, for anhydrous drugs the use of this technique has not been studied.

The objective of this study was to obtain hollow crystals of DFZ by antisolvent crystallization under different preparation conditions. In addition, the physicochemical characteristics of the micronized and crystalline raw materials and crystallized samples were determined and their association with the dissolution rate was investigated.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 MATERIALS

DFZ was obtained from Taizhou Taifa Pharma Co., Ltd, China and the raw materials were purchased from Brazilian suppliers and identified as: RM1 (micronized raw material) and RM2 (crystalline raw material). The DFZ samples crystallized in methanol/water were identified as R4.

2.2 ANTISOLVENT CRYSTALLIZATION OF DFZ

Deflazacort was used as received and sample solutions were prepared by dissolving appropriate amounts of DFZ in methanol (25 mg mL⁻¹) and heating to 65 °C. Water was used as the antisolvent and was added immediately. Solutions were left to stand (for 4 or 60 min) or stirred (for 4 min) at room temperature. The proportions of methanol:water used were: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 and 1:6 (v/v).

Crystallized samples were retained in a quantitative filter (pore size 28 μm), oven dried at 50°C and weighed on an analytical balance.

2.3 SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM).

The morphologies of the raw materials and crystallized samples of DFZ were determined by scanning electron microscopy (SEM). SEM images were taken using a Jeol JSM-6390LV scanning electron microscope (Jeol, USA). The samples were mounted with carbon adhesive on an aluminum holder, sputtered with gold and photographed at a voltage of 15 Kv.

2.4 X-RAY DIFFRACTION

X-ray diffraction (XRPD) measurements were performed on a PANalytical X'pert PRO Multi-Purpose Diffractometer (PANalytical, USA), using monochromatized Cu $K_{\alpha 1}$ radiation ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) operating at 45 kV and 40 mA. The samples were supported in 0.7 mm quartz capillary holders coupled to a spinner to avoid the effect known as preferred orientation of the sample.

2.5 PARTICLE SIZE DETERMINATION

The particle size distributions were determined by optical microscopy using an Axio Imager M2m, with an AxioCam MRc5 digital camera and AxioVision v4.7 software to capture and analyze the images (Carl Zeiss, Germany) and scanning electron microscopy using a Jeol DJSM 6510LV microscope (Jeol, USA). Pictures were taken from different areas of the samples until 90 particles were considered. The micronized raw material, RM1, was observed by SEM since the particles were too small for optical microscopy.

2.6 DENSITY AND SURFACE AREA MEASUREMENTS

Sample volume was determined using an Ultrapyc 1200e gas pycnometer (Quantachrome instruments, USA) by measuring the pressure change of helium in a calibrated volume. Sample density was calculated from the ratio between the weight and volume of the DFZ samples.

The N₂ adsorption measurements were carried out using a Nova 1200 gas sorption analyzer (Quantachrome instruments, USA), surface area range: 0.01m²/g to no known upper limit; adsorption and desorption isotherms; pore size range: 3.5 to >4000 Å; minimum pore volume: Liquid: 2 x 10⁻⁶ cc/g; STP: 0.0001 cc/g. The N₂ adsorption technique was applied to quantify the surface area characteristics by measuring the amount of N₂ adsorbed onto and desorbed from a porous solid material over a wide range of relative pressures (P/P₀, where P is the equilibrium pressure and P₀ is the saturation pressure). The adsorption isotherms obtained from these adsorption measurements allow the determination of the surface area. The specific surface area was calculated based on Brunauer, Emmett and Teller (BET) theory (Brunauer, Emmett, & Teller, 1938) from the linear part of the adsorption isotherm, at pressures of 0.05 < P/P₀ < 0.30. All of the samples were degassed at 25 °C for 120 min under vacuum.

2.7 INTRINSIC DISSOLUTION RATE (IDR)

The IDR of the samples was measured with a rotating disk apparatus in a die of 8 mm diameter (surface area 0.5 cm²) according to USP 31, 2008. A mass of 100 mg of the samples, accurately weighed, was then compacted in a universal testing apparatus (Asta, Brazil), using a compaction pressure of 12,000 psi, in order to form a non-disintegrating compact pellet. Intrinsic dissolution studies were performed with 200 mL of dissolution medium: degassed water or water containing 0.05% (p/v) of sodium dodecyl sulfate (SDS), at 37 ± 0.5 °C and 100 rpm. Aliquots (5 mL) were withdrawn (with replacement) at time intervals of 30, 40, 50, 60, 90 and 120 min and filtered. The dissolution test to determine the IDR was carried out under sink conditions. The concentrations of RM1, RM2 and R4 after 120 min were 2.3 µg/mL, 2.87 µg/mL and 3.07 µg/mL. The solubility under the test conditions was 75 µg/mL. Therefore, the concentrations applied in the IDR experiments were below 7.5 µg/mL (10% of the saturation concentration).

All sample solutions were protected from the light until analysis. The DFZ concentration of the aliquot was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) on a Shimadzu system (Shimadzu, Japan) composed of an LC-10 ADVP pump, an SCL-10 AVP system controller, an SIL-10 ADVP auto-injector and a degasser module. Data were acquired and processed using the Shimadzu CLASS-

VP 5.032 software (Shimadzu, Japan). A C18 (250 x 4.6 mm, i.d., 4 μ m particle size) column was used (Luna Phenomenex, Torrance, CA - USA). The mobile phase consisted of acetonitrile:water (80:20, v/v), applied at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The injection volume was 20 μ L and the detection wavelength was 244 nm. The dissolution assay was evaluated in triplicate.

2.8 DISSOLUTION PROFILE

The dissolution profiles were determined for the raw material and crystallized samples using the method developed by Sperandeo and Kassuha (SPERANDEO AND KASSUHA, 2009). Dissolution studies were performed in a Varian dissolution test system VK 7000 (Varian, USA), using a USP apparatus in 500 mL of dissolution media: purified water or water containing 0.05, 0.5 or 1.0% (p/v) of SDS at a temperature of 37.0 \pm 0.5 $^{\circ}$ C. A mass of 30 mg of the RM1, RM2 or R4 sample was accurately weighed and added to the vessel under an agitation rate of 50 rpm. Aliquots (10 mL) were withdrawn (with replacement) at time intervals of 10, 20, 30, 40, 60 and 120 min and filtered. All sample solutions were protected from the light until analysis. The cumulative percentage of DFZ released (%R) was determined by HPLC assay, using the conditions described above. The dissolution assay was evaluated in triplicate.

2.9. DISSOLUTION EFFICIENCY (DE)

The dissolution efficiency (DE) was calculated to compare the relative performance of the raw materials and hollow crystals. Percent dissolution efficiency (%DE) is defined as the area under the dissolution curve (AUC_{0-t}) up to a certain time, t , expressed as a percentage of the area of the rectangle described (AUC_{TR}) by 100% dissolution within the same time (COSTA AND SOUSA LOBO, 2001). The %DE was calculated according to the following formula:

$$DE = \frac{AUC_{(0-t)}}{AUC_{TR}} \times 100$$

The %DE values were calculated to compare the relative performance of the raw materials (RM1, RM2) and the hollow crystals

of DFZ. The results were expressed as mean values \pm SD (n=3). Statistical comparisons were carried out applying the Student's t-test of comparison. $P < 0.05$ was considered to be significant employing the GRAPH PAD PRISM INSTAT program (San Diego, USA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 ANTISOLVENT CRYSTALLIZATION

This study describes a method for the production of hollow crystals of DFZ in which a large number of small crystals were formed by antisolvent crystallization. This could be observed at the moment when the antisolvent (water) was added to the DFZ solution. Hollow crystals were formed with water added in proportions of 1:1 to 1:6 methanol:water, without stirring, within 4 min. On using proportions of water of 1:2 or higher the crystals had similar lengths, widths and openings. The scanning electron microscopy (SEM) images in Figure 1 show tubular crystals, free of irregularities, porous and with a well-defined surface.

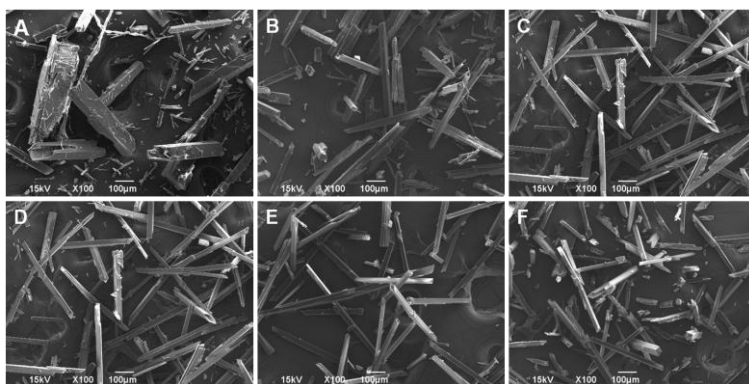


Figure 1: Scanning electron micrographs of tubular crystals of DFZ crystallized with methanol:water (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 and 1:6), after 4 minutes, without stirring

The crystals formed using a methanol:water ratio of 1:3 had a more regular geometry, and all crystals had a hollow tubular shape, as demonstrated in Figure 2. Hollow tubular crystals were also observed after 60 min without stirring; however, these presented an irregular shape. The application of longer crystallization times produced crystals with lengths and widths that varied according to the amount of water added and which were larger than those formed within 4 min.

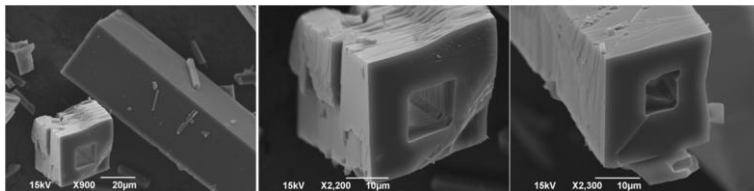


Figure 2: Scanning electron micrographs of tubular crystals of DFZ crystallized by methanol:water (1:3), after 4 minutes, without stirring.

The effects of stirring on the crystallization process were studied and Figure 3 shows the crystals obtained by the antisolvent method without stirring, with magnetic stirring and with sonication at a time of 4 min. Figures 3A, 3B and 3C show the formation of hollow crystals without stirring. The use of a proportion of 1:1 methanol:water and stirring led to the formation of solid crystals, with well-defined crystalline faces, as shown in Figs. 3D and 3G. Hollow crystals were not observed in these samples, however, a mixture of hollow crystals and solid crystals were observed with proportions of 1:3 and 1:6, as demonstrated in Figs. 3E, 3H, 3F, 3I, demonstrating that the amount of water is directly related to the formation of hollow crystals. Stirring of a sample during crystallization promotes crystallite homogeneity and is likely to result in the formation of solid, non tubular crystals. Stirring reduces or eliminates the concentration gradients across growing crystal faces that are necessary for tubular crystal formation (Eddleston and Jones, 2010).

Considering that hollow crystals were obtained under all crystallization conditions without stirring, we studied the percentage of crystallized material obtained, as shown in Table 1. The proportion of 1:3 allowed a larger percentage of recovery for both crystallization times, demonstrating that water directly affects the crystallization process. A proportion of 1:3 methanol:water and a time of 4 min, without stirring, were the best conditions in terms of the crystal characteristics and mass obtained. The samples obtained under these conditions were denominated R4 and were used for the comparison with the raw materials. X-ray powder diffraction measurements showed the same crystalline form for all crystallized samples (data not shown).

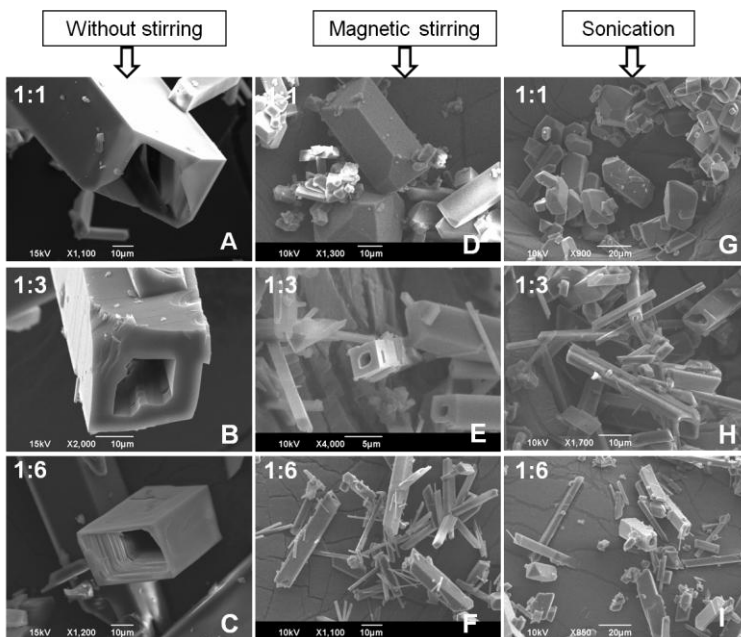


Figure 3: Scanning electron micrographs of tubular crystals of DFZ crystallized by methanol:water (1:1, 1:3 and 1:6), without stirring (A, B, C), with magnetic stirring (D, E, F) and with sonication (G, H, I) for 4 min.

Table 1: Percentage of crystallized mass obtained by antisolvent crystallization at time 4 and 60 minutes, without stirring.

| Methanol:water (v/v) | Percentage of crystallized mass (%) | |
|----------------------|-------------------------------------|------------|
| | 4 minutes | 60 minutes |
| (1:1) | 2,0 | 44,3 |
| (1:2) | 59,8 | 64,5 |
| (1:3) | 83,3 | 84,5 |
| (1:4) | 46,7 | 59,9 |
| (1:5) | 26,7 | 40,6 |
| (1:6) | 55,1 | 66,2 |

3.2 PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION

Micronization is used to improve the solubility, dissolution rate and, consequently, the bioavailability of poorly soluble drugs. On the Brazilian market raw materials are found in micronized and crystalline forms. In this study, the raw materials (RM1, RM2) and a crystallized sample (R4) of DFZ (Figure 4A) were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) to confirm the chemical stability and X-ray diffraction (XRD), differential scanning calorimetry (DSC) and diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFT) to confirm the polymorphic forms. The results for RM1 are shown in Figure 4. The HPLC, XRD, DSC and DRIFT for RM2 and R4 samples provided similar results (data not shown). The XRD data showed that all samples presented the same crystalline structure; however, relevant differences in the crystal morphology were observed by scanning electron microscopy (SEM) and through the particle size distribution.

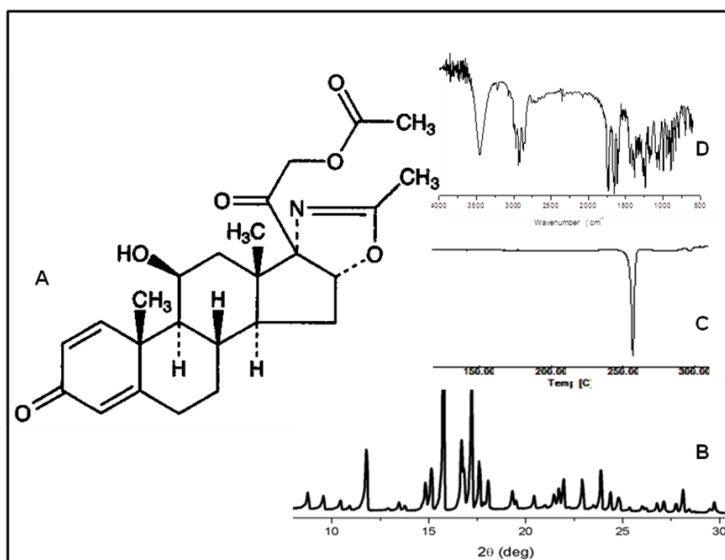


Figure 4: (A) Chemical structure of deflazacort; (B) X-Ray Diffraction; (C) Differential Scanning Calorimetry; (D) Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform spectroscopy of RM1.

The SEM analysis revealed that the particles presented distinct crystalline behaviors and were irregularly shaped. RM1 appeared as an aggregate with small crystals, a smooth surface and a homogeneous morphology, whereas RM2 presented larger particles with columnar and rectangular shapes. The crystallized sample R4 showed hollow crystals, an acicular shape free of irregularities and a well-defined surface (Figure 5).

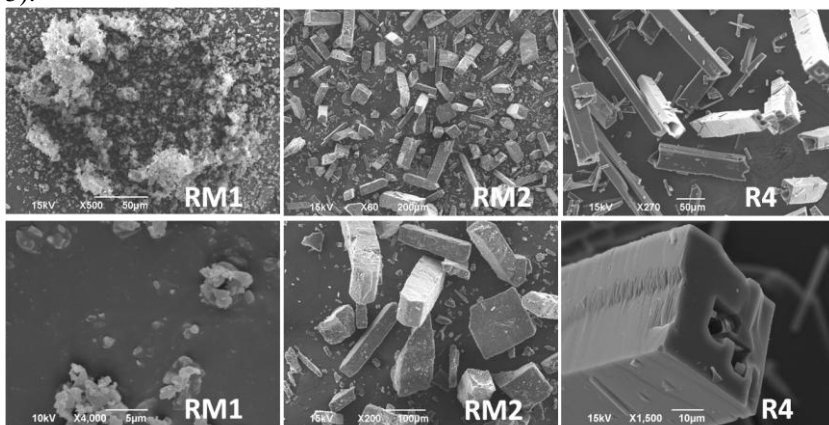


Figure 5: Scanning Electron micrographs of DFZ raw materials (RM1, RM2) and hollow tubular crystals (R4).

The particle distributions, density and surface area are given in Table 2. The particle size distribution of RM1 (micronized sample), showed a peak at around 5 μm and surface area of 4.2 m^2/g , as would be expected on applying the micronization process, but there was also a small amount of very large particles. A small amount of aggregated material is also present at around 100 μm . The sample RM2 showed a broad distribution and the smallest surface area. The crystallized sample R4 presented a distribution with a peak at around 561 μm , however the surface area was around half that observed for RM1 but was larger than that of RM2. RM2 had a smaller particle size than R4, the larger surface area of the latter probably being due to the morphology, i.e., hollow crystals.

Table 2: Mean values and standard deviation for the particle size distributions, density and surface area

| Sample | Particle size: Mean Value (μm) \pm SD | Density (g/cm^3) | Surface area (m^2/g) |
|--------|--|------------------------------------|--|
| RM1 | 3.3 ± 4.7 | 1.3824 | 4.2 |
| RM2 | 63.6 ± 38.8 | 1.2259 | 0.4 |
| R4 | 561.0 ± 132.0 | 1.3692 | 1.9 |

3.3 DISSOLUTION BEHAVIOR

The behavior of the raw materials and crystallized samples was then analyzed through the IDR in water or an aqueous medium containing 0.05% of an anionic surfactant (SDS). The IDR results (Figure 6) showed a high reproducibility and linearity ($R > 0.99$). For RM1 the intrinsic dissolution rate in water was lower than for RM2 and R4 (Figure 6A). The IDR ($\text{mg cm}^{-2} \text{min}^{-1}$) values calculated are given in Table 3. The IDR was selected so as to avoid the particle size and surface area effects on the dissolution rate, in order to evaluate the other physical properties, such as polymorphism, and their effect on the dissolution rate (BRITTAİN, 2009). Since all samples presented the same crystalline structure, the results obtained were unexpected and indicated that the IDR could be affected by factors other than polymorphism. The addition of 0.05% SDS to the dissolution medium led to an increase in the dissolution rate of the micronized sample (RM1, see Figure 6B and Table 3), with the same IDR behavior being observed for all samples. Therefore, the wettability of the micronized sample was significantly improved. The IDR results, with and without surfactants agents, showed that the samples had different characteristics in relation to their wettability.

The dissolution rates in water (Figure 7A) and water with 0.05% SDS (Figure 7B) were determined due to the differences found in the particle size distributions and IDR. The dissolution profiles for RM1, RM2 and R4 varied. The difference between RM1 and RM2 is due to the particle size. However, RM1 had a lower dissolution profile than R4, which was unexpected since the micronized material RM1 had a larger surface area than R4 (Table 2). The micronization process should increase the surface area and, as a consequence, the dissolution rate.

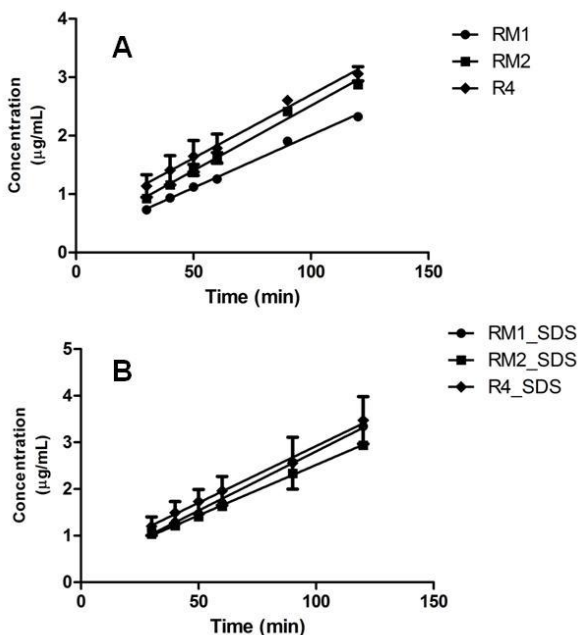


Figure 6: Intrinsic dissolution curves for RM1, RM2 and R4 (A) in dissolution medium containing water and (B) in water containing 0.05% sodium lauryl sulfate (SDS). Each point represents mean \pm SEM (n=3).

Table 3: Results for IDR of raw materials and crystallized sample in pure water or 0.05% SDS.

| Sample | IDR ($\text{mg cm}^{-2} \text{min}^{-1}$) \pm SD | |
|--------|--|--|
| | Dissolution medium: pure water | Dissolution medium: 0.05% SDS |
| RM1 | $1.38 \times 10^{-4} \pm 2.5 \times 10^{-6}$ | $2.82 \times 10^{-4} \pm 1.6 \times 10^{-5}$ |
| RM2 | $2.15 \times 10^{-4} \pm 1.2 \times 10^{-6}$ | $2.33 \times 10^{-4} \pm 3.0 \times 10^{-5}$ |
| R4 | $2.21 \times 10^{-4} \pm 1.6 \times 10^{-6}$ | $2.82 \times 10^{-4} \pm 1.2 \times 10^{-4}$ |

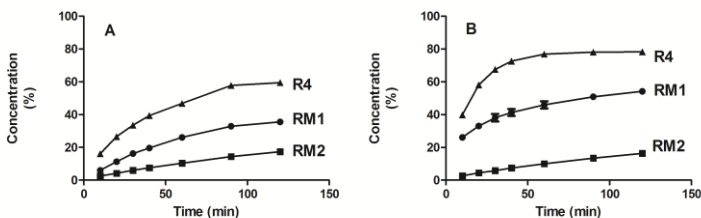


Figure 7: Dissolution profiles for RM1, RM2 and R4: (A) in water; (B) in water with 0.05% SDS. Each point represents mean \pm SEM ($n=3$).

SDS was used in an amount below (0.05%) or above the critical micelle concentration (0.5 and 1%) and the results demonstrated that an increase in the concentration of SDS promoted faster dissolution (Figure 8). In the case of RM1 the dissolution was around 90% after 90 min (Figure 8 A) while R4 reached 94% in the first 10 min (Figure 8C). This difference occurred due to the agglomeration of the particles in the micronized sample, which was observed in the SEM and particle size determination. RM1 does not behave like a particle of 3.3 μm , but rather as a particle of $>63.6 \mu\text{m}$ (RM2). The micronization process changes the surface properties, as previously reported for organic crystalline materials, such as less soluble drugs like carbamazepine (Perkins et al., 2009), and highly soluble drugs like paracetamol (Heng et al., 2006; Heng and Williams, 2006), salbutamol (Gaisford et al., 2010), revatropate hydrobromide (Ticehurst et al., 2000) and acetylsalicylic acid (Torrado, 1998). This is discussed in the context of the micronizer residence time, the resulting particle morphology and size distribution, and the possible mechanisms that increase the surface energy. Changes in the mechanical properties and an increase in the surface energy can lead to particle agglomeration (Perkins et al., 2009) and also affect the wettability.

R4 (Figure 8C) showed a better dissolution profile under all conditions studied, despite having a greater particle size than the micronized sample. This can be explained by the lack of particle agglomeration. However, the crystalline morphology also plays a role in this case and the values for the "wall thickness" of the hollow crystals were around 5 to 10 μm . In the case of the hollow crystal morphology, the "wall thickness" may be the most effective factor for size comparison purposes. In addition, RM2 (Figure 8B) showed a dissolution maxima of around 57% using 1% of SDS, which can be

attributed to the larger particle size and greater crystalline order in relation to RM1. Taking into account only the wall thickness, RM2 would also be larger than the R4 sample.

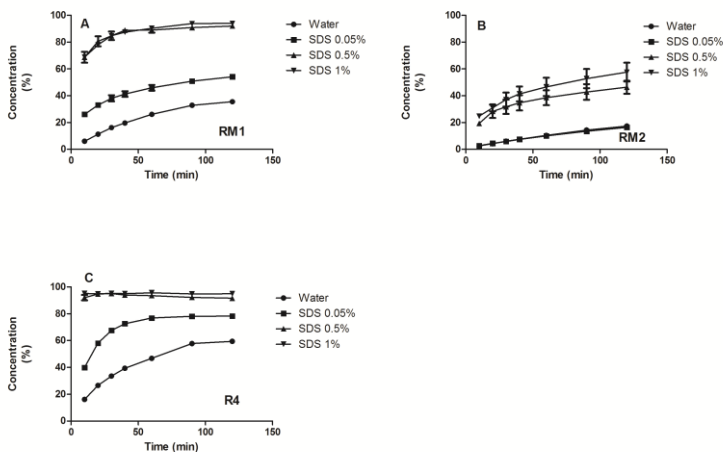


Figure 8: Dissolution profiles for RM1, RM2 and R4 in water or water containing 0.05%, 0.5% and 1% of SDS. Each point represents mean \pm SEM (n=3).

The raw materials and hollow crystals were compared in terms of the dissolution efficiency (DE), which is related to the real amount of drug dissolved in the dissolution medium. The values obtained are shown in Table 4 and the statistical analysis was performed by comparison employing the Student's t-test. P values of less than 0.05 were considered as indicative of significance. R4 presented a significantly higher dissolution efficiency in water and water with 0.05% SDS. These results demonstrate that the dissolution efficiency of the hollow crystals (R4) was significantly greater than in the case of the micronized (RM1) and crystalline (RM2) raw materials, in both dissolution media.

Table 4: Average dissolution efficiency of RM1, RM2 and R4 in water or water containing 0.05% SDS, with a confidence interval of 95%.

| | RM1 (%) \pm SD | RM2 (%) \pm SD | R4 (%) \pm SD |
|------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| Water | 64.72 \pm 1.28 | 56.55 \pm 0.38 | 71.07 \pm 1.18 |
| 0.05% SDS | 76.15 \pm 1.22 | 57.43 \pm 0.80 | 84.93 \pm 0.12 |

Different parameters can affect the dissolution of drugs, such as wettability, particle size, crystalline structure, microstructure, surface area and surface properties. Different crystal forms of a particular drug possess different planes and thus they differ not only in their specific surface conditions but may exhibit different biopharmaceutical properties (GAREKANI ET AL, 2001). The crystallization process is an important method for obtaining hollow crystals of DFZ and improves the dissolution profile and, consequently, the bioavailability.

4. CONCLUSIONS

Crystallization is crucial in the pharmaceutical industry as a separation process for intermediates and as the final step in the manufacture of active pharmaceutical ingredients. The antisolvent crystallization process allowed the formation of hollow crystals of DFZ, which demonstrated a better dissolution profile than the micronized and crystalline raw material. The IDR results revealed wettability problems associated with the micronized raw material, which can be resolved with the addition of a surfactant. However, other factors affect the dissolution profile, such particle size, agglomeration, crystalline structure and morphology. The particle size and surface area affect the dissolution profile, although in the case of hollow crystals the dissolution may also be dependent on the wettability and morphology (crystal habit). The dissolution is not necessarily increased by the micronization process, as shown in the case of RM1. The physicochemical modifications caused by this process need to be studied and controlled, particularly in the case of poorly soluble drugs, since they may considerably affect the dissolution rate with well-known consequences in terms of the drug bioavailability. Crystallization strategies aimed at changing the crystal habit, as in the case of the hollow crystals of Deflazacort, could be a promising approach to enhancing the dissolution of poorly soluble drugs.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank CNPq and CAPES for financial support and student fellowships. Silvia L. Cuffini thanks CAPES for a Visiting Professor grant and CONICET Argentina for fellowships. The authors would also like to thank LDRX-UFSC for technical support during the X-ray diffraction analysis and Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC) for SEM measurements.

REFERENCES

BRITTAİN, H. G. **Polymorphism in Pharmaceutical Solids**. 2. ed.

USA: [s.n.], 2009. p. 640

CHAUMEIL, J. C. Micronization: a method of improving the bioavailability of poorly soluble drugs. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 20, n. 3, p. 211–5, abr 1998.

CHEN, J.; SARMA, B.; EVANS, J. M. B.; MYERSON, A. S.

Pharmaceutical Crystallization Published as part of the Crystal Growth & Design 10th Anniversary Perspective. **Crystal Growth & Design**, v. 11, p. 887–895, 2011.

CHO, E.; CHO, W.; CHA, K.-H.; PARK, J.; KIM, M.-S.; KIM, J.-S.; PARK, H.J.; HWANG, S.-J. Enhanced dissolution of megestrol acetate microcrystals prepared by antisolvent precipitation process using hydrophilic additives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 396, n. 1-2, p. 91–8, 30 ago 2010.

COHEN, J.; HENRY, R. A.; SKOLNIK, S. Hollow Crystals of Nitroguanidine Vacuum Differential Thermal Analysis ". **Science**, v. 111, p. 278–279, 1950.

COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123–33, maio 2001.

DETTE, S.S.; STELZER, T.; JONES, M. J.; COQUEREL, G.; ULRICH, J. Fascinating control of crystalline microstructures. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 88, n. 9, p. 1158–1162, set 2010.

DETTE, S. S.; STELZER, T.; JONES, M. J.; ULRICH, J. Dehydration behaviour of hydrates. **Crystal Research and Technology**, v. 45, n. 7, p. 697–702, 23 abr 2010.

DETTE, S. S.; STELZER, T.; RO, E.; JONES, M. J.; ULRICH, J. Controlling the Internal Diameter of Nanotubes by Changing the Concentration of the Antisolvent 2007. **Crystal Growth & Design**, v. 7, p. 7–9, 2007.

DONG, Y.; NG, W. K.; SHEN, S.; KIM, S.; TAN, R. B. H. Preparation and characterization of spironolactone nanoparticles by antisolvent precipitation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 375, n. 1-2, p. 84–8, 22 jun 2009.

EDDLESTON, M. D.; JONES, W. Formation of Tubular Crystals of Pharmaceutical Compounds. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 1, p. 365–370, 6 jan 2010.

GAISFORD, S.; DENNISON, M.; TAWFIK, M.; JONES, M. D. Following mechanical activation of salbutamol sulphate during ball-

milling with isothermal calorimetry. **International journal of pharmaceutics**, v. 393, n. 1-2, p. 74–8, jun 2010.

GARCIA, E.; BOISTELLE, R.; HOFF, C. Crystallization and dissolution of pharmaceutical compounds An experimental approach. **Journal of Crystal Growth**, v. 199, p. 1360–1364, 1999.

HENG, J. Y. Y.; THIELMANN, F.; WILLIAMS, D. R. The effects of milling on the surface properties of form I paracetamol crystals. **Pharmaceutical research**, v. 23, n. 8, p. 1918–27, ago 2006.

HENG, J. Y. Y.; WILLIAMS, D. R. Wettability of paracetamol polymorphic forms I and II. **Langmuir : the ACS Journal of Surfaces and Colloids**, v. 22, n. 16, p. 6905–9, 1 ago 2006.

JOSHI, N.; RAJESHWARI, K. Deflazacort. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 55, n. 4, p. 296–300, 2009.

KAWABATA, Y.; WADA, K.; NAKATANI, M.; YAMADA, S.; ONOUE, S. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 1–10, 25 nov 2011.

KESISOGLOU, F.; PANMAI, S.; WU, Y. Nanosizing--oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 631–44, jul 2007.

MALLET, F.; PETIT, S.; LAFONT, S.; BILLOT, P.; LEMARCHAND, D.; COQUEREL, G. Crystal Growth Mechanism in a Solution of

Hollow Wiskers of Molecular Compounds. **Crystal Growth & Design**, v. 4, n. 5, p. 965–969, 2004.

MANISH, M.; HARSHAL, J.; ANANT, P. Melt sonocrystallization of ibuprofen: effect on crystal properties. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, n. 1, p. 41–8, maio 2005.

MARTINS, D.; STELZER, T.; ULRICH, J. Formation of Crystalline Hollow Whiskers as Relics of Organic Dissipative Structures b b. **Crystal Growth & Design**, v. 11, p. 3020–3026, 2011.

NIWA, K.; IKEGAYA, H.; HASEGAWA, M.; OHSUNA, T.; YAGI, T. Submicron rectangular hollow tube crystals of rutile-type GeO₂. **Journal of Crystal Growth**, v. 312, n. 10, p. 1731–1735, maio 2010.

PASQUALI, I.; BETTINI, R.; GIORDANO, F. Solid-state chemistry and particle engineering with supercritical fluids in pharmaceuticals. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 4, p. 299–310, mar 2006.

PATIL, S. K.; WAGH, K. S.; PARIK, V. B.; AKARTE, A. M.; BAVISKAR, D. T. Strategies for solubility enhancement of poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 8, n. 2, p. 74–80, 2011.

PERKINS, M.C.; BUNKER, M.; JAMES, J.; RIGBY-SINGLETON, S.; LEDRU, J.; MADDEN-SMITH, C.; LUK, S.; PATEL, N.; ROBERTS, C.J. Towards the understanding and prediction of material changes during micronisation using atomic force microscopy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 1, p. 1–8, ago 2009.

SCHUSTER, A.; STELZER, T.; ULRICH, J. Generation of Crystalline Hollow Needles: New Approach by Liquid-Liquid Phase Transformation. **Chemical Engineering & Technology**, v. 34, n. 4, p. 599–603, 2 abr 2011.

SPERANDEO, N. R. Development and Validation of a Dissolution Test for 6 mg Deflazacort Tablets. **Scientia Pharmaceutica**, v. 77, n. 3, p. 679–693, 2009.

TICEHURST, M.D.; BASFORD, P. A; DALLMAN, C.I.; LUKAS, T.M.; MARSHALL, P. V; NICHOLS, G.; SMITH, D. Characterisation of the influence of micronisation on the crystallinity and physical stability of revatropate hydrobromide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 193, n. 2, p. 247–59, jan 2000.

TORRADO, G. Process-induced crystallite size and dissolution changes elucidated by a variety of analytical methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 166, n. 1, p. 55–63, maio 1998.

VIÇOSA, A.; LETOURNEAU, J.-J.; ESPITALIER, F.; INÊS RÉ, M. An innovative antisolvent precipitation process as a promising technique to prepare ultrafine rifampicin particles. **Journal of Crystal Growth**, v. 342, n. 1, p. 80–87, mar 2012.

WACHSMUTH, A.; STELZER, T.; ULRICH, J. Decreasing the Diameter of Crystalline Tubes and an Approach to Explain its Nucleation. **Chemical Engineering & Technology**, v. 34, n. 4, p. 578–582, 2 abr 2011.

WANG, Z.; CHEN, J.-F.; LE, Y.; SHEN, Z.-G.; YUN, J. Preparation of Ultrafine Beclomethasone Dipropionate Drug Powder by Antisolvent

Precipitation. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, n. 14, p. 4839–4845, jul 2007.

YANG, X.; FU, J.; JIN, C.; CHEN, J.; LIANG, C.; WU, M.; ZHOU, W. Formation mechanism of CaTiO₃ hollow crystals with different microstructures. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 40, p. 14279–87, 13 out 2010.

**CAPÍTULO 4: ARTIGO 3 – CRYSTAL GROWTH
MECHANISMS OF DEFLAZACORT HOLLOW CRYSTAL:
ENVOLVIMENT TO BERG EFFECT**

APRESENTAÇÃO

O processo de cristalização é uma técnica amplamente empregada para produzir uma variedade de materiais na indústria farmacêutica, e impacta diretamente nas propriedades do estado sólido, assim como na estabilidade e desempenho do produto.

Os cristais ocos têm sido pesquisados em diversas áreas, sendo que recentemente começaram a ser estudados na área farmacêutica.

O mecanismo de crescimento deste tipo de cristal é complexo e diversos mecanismos têm sido descritos na literatura, no entanto parecem ser mecanismos particulares de alguns fármacos. Conhecer o mecanismo de crescimento dos cristais permite um maior controle sobre o hábito cristalino, que está diretamente relacionado com a aparência externa do cristal e depende das condições de crescimento, sendo resultado da velocidade de crescimento das diferentes faces do cristal.

Diversos fatores interferem no hábito cristalino podendo ser dependentes da estrutura do cristal (polimorfismo) e dos defeitos cristalinos. Além disso, fatores externos tais como a supersaturação, natureza do solvente, composição da solução, impurezas, condições físicas (temperatura, fluxo, campo magnético, ultrassom...) vão impactar diretamente no hábito cristalino. Entender e controlar este mecanismo de crescimento dos cristais é um fator extremamente importante por esta ser uma etapa crítica do processo de cristalização.

O presente capítulo é dedicado a compreender o processo de cristalização e propor o mecanismo de crescimento do cristal oco de DFZ com o objetivo de entender melhor a formação destes cristais na área farmacêutica e assim contribuir para o estudo de outros fármacos.

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos com avaliação *in situ*, utilizando o processo de cristalização pelo método de antissolvente. As técnicas utilizadas foram: microscopia óptica de luz polarizada, microscopia eletrônica de varredura, microscopia confocal e difração de raio x.

CRYSTAL GROWTH MECHANISMS OF DEFLAZACORT HOLLOW CRYSTAL: ENVOLVIMENT TO BERG EFFECT

Amarilis Scremin Paulino^a, María Angeles Hernández y Hernández^b; Alexander E.S. Van Driessche^b, Duane Choquesillo Lazarte^b; Luis Antonio González Ramírez^b, Juan Manuel Garcia Ruiz^b, Simone Gonçalves Cardoso^a, Silvia Lucia Cuffini^{ac}

^a Programa Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, (Florianópolis-Brasil)

^b Laboratorio de Estudios Crystalograficos, IACT, CSIC – Universidad Granada, Spain.

^c CONICET-CEPROCOR – MinCyT. Córdoba, Argentina

Corresponding Author: Amarilis Scremin Paulino, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Laboratório Controle de Qualidade. 88040-900 - Trindade – Florianópolis – SC, Brasil.

Fone: (55) 48-3721-5066

E-mail: amarilis_paulino@yahoo.com.br

Abstract

The mechanism of hollow crystals formation is complex and it was showed that this morphology improved dissolution rate of poorly soluble drugs. Crystallization process is a critical step on pharmaceutical industry and it is extremely important to know and to understand the crystallization mechanisms DFZ hollow crystals were obtained by antisolvent method. The growth mechanism was investigated *in situ* by optical microscopy and Laser Confocal Differential Interference Contrast Microscopy (LCM-DIM). Hollow crystals were evaluated by Scanning Electron Microscopy (SEM) and X-Ray Crystal Diffraction. This study has shown that spiral growth is the main mechanism and Berg effect have a pronounced effect on surface kinetics. Hollow crystals initially nucleate as polyhedral shape and driving force increase lead to hollow crystal formation. X-Ray Crystal Diffraction demonstrated that it grows anisotropically in the face (100). Amount of antisolvent and driving force are important factors in the growth of hollow crystal since changed the crystallization rate. These results propose that hollow crystals are formed between the end of the Berg effect and the beginning of the diffusion-limited crystallization. The present study contributes to understanding the crystallization process and the growth mechanism of DFZ hollow crystal, and enriches our knowledge in field of pharmaceutical hollow crystal.

Keywords: Hollow crystal; Growth Mechanism; Berg effect; Characterization; poorly soluble drugs.

1. INTRODUCTION

Hollow crystal is a solid form produced from a special crystal growth. Several reports of hollow crystal have been described in literature and the perfect elucidation of these hollow crystal growths' have a current much interest. There are many reports to explain the crystallization mechanism of inorganic compounds, although the studies of organic compounds are few, especially in pharmaceutical area.

The mechanism of hollow crystals growth is complex and several different underlying mechanisms have been proposed to explain this particular crystal growth. Hollow crystal can be obtained from solvates by phase transition to anhydrous phase (DETTE, et al., 2010; DETTE, et al., 2010; DETTE, SEVERINE et al., 2007; MALLET, FRANK et al., 2004), by a matter transport inside the tubular particles by convective heat transfer (MARTINS et al., 2011), reversed crystal growth (GREER et al., 2009; MOREIRA et al., 2011; SANDER et al., 2012; YANG et al., 2010; ZHOU, 2010), diffusion-limited crystallization (EDDLESTON; JONES, 2010; PERRY et al., 2013; POODT et al., 2009) and Berg Effect (BERG, 1938).

Crystallization form a specific polyhedral form through a kinetic-controlled reaction and Berg effect leads to the formation of a hopper shape, due driving force increases (OAKI; IMAI, 2003; PAN et al., 2007). Berg demonstrated a mechanism for inorganic compounds and showed that concentration is not constant all over the crystal surface, but is higher at the corners and lower at the centre of its faces (BERG, 1938).

Diffusion-limited growth processes occur in a broad range of interesting systems and materials. The common features which are usually observed in these systems are the formation of complex interfacial structure that varies from dendrites to fractal morphologies (BOGOYAVLENSKIY; CHERNOVA, 2000). These morphologies are attributed to instability of the growing surface in a diffusion field (OAKI; IMAI, 2003). The morphology of crystals changed from specific polyhedral forms into various dendrites forms and it is dependent of driving forces. This change is caused initially by the Berg effect with formation of hopper crystal, following by limited-diffusion creating dendrites forms (OAKI; IMAI, 2003).

Deflazacort (DFZ) is an anhydrous and poorly soluble drug used in inflammatory diseases (JOSHI; RAJESHWARI, 2009) and hollow crystal of this drug were recently studied by antisolvent crystallization

(PAULINO et al., 2013). This hollow crystals demonstrated a better dissolution profile than the micronized and crystalline raw material (PAULINO et al., 2013). In pharmaceutical area, dissolution of drug is the rate determining step for oral absorption of the poorly soluble drugs and low dissolution rate in the aqueous gastrointestinal fluids often cause insufficient bioavailability (SAVJANI et al., 2012). Hollow crystal morphology improved dissolution rate of poorly soluble drugs, however crystallization process is a critical step on pharmaceutical industry. It is extremely important to know and to understand the mechanisms of crystallization, since it is crucial for the design and operation of industrial crystallizers. The mechanisms of DFZ hollow crystals formation using antisolvent method remain unknown. The present study is dedicated to understanding the crystallization process and proposes the growth mechanism of DFZ hollow crystal, in order to enrich our knowledge in field of pharmaceutical hollow crystal.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 SAMPLE, SOLUTIONS AND ANTISOLVENT CRYSTALLIZATION

DFZ was obtained from Taizhou Taifa Pharma Co., Ltd, China and was used as received. DFZ sample solution was prepared by dissolving appropriate amounts of DFZ in methanol (DFZ-MeOH) at concentrations of 12.5; 25, 35, 45 and 60 mg/mL and heating to 65 °C. Filtered DFZ-MeOH solutions were maintained in closed glass vial at ambient temperature or open crystallizer at 40 °C to observe possible crystallization of hollow crystal in pure methanol. Antisolvent method was used to obtain hollow crystal. High-purity water was added into DFZ-MeOH solution at concentrations of 12.5, 25 and 35 mg/mL, in the following proportion (DFZ-MeOH:water): 1:1/2; 1:1; 1:2; 1:3 . After adding the water, the sample remained undisturbed under a vapor atmosphere, in open or closed crystallizer.

The solubility of saturated solution of DFZ in methanol or methanol:water (1:0; 1:1/2; 1:1; 1:2; 1:3) was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) on a Shimadzu system (Shimadzu, Japan) composed of an LC-10 ADVP pump, an SCL-10 AVP system controller, an SIL-10 ADVP auto-injector and a degasser module. Data were acquired and processed using the Shimadzu CLASS-VP 5.032 software (Shimadzu, Japan). A C18 (250 x 4.6 mm, i.d., 4 µm particle size) column was used (Luna Phenomenex, Torrance, CA - USA). The mobile phase consisted of acetonitrile:water (80:20, v/v), applied at a flow rate of 1.0 mL/min. The injection volume was 20 µL and the detection wavelength was 244 nm (SCREMIN et al., 2010).

2.2 OPTICAL MICROSCOPY AND CRYSTAL GROWTH INVESTIGATIONS

The growth of hollow crystals were recorded using an optical microscope Nikon AZ100 with long working distance objectives and attached high resolution CCD camera. The growth of the hollow crystal was being recorded with a time lapse of one second. The frames were coded into movies at an accelerated frame rate with dedicated software.

The growth rates from the on-line images associated with the crystal length and width was determinate by Crystal Growth Meter.

2.3 SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM)

Scanning electron microscopy (SEM) photographs were obtained from crystals grown in solution. They were harvested using a very thin paintbrush. After the retrieval they were stuck onto carbon adhesive films placed on aluminum SEM stubs and were coated with carbon to obtain high-resolution SEM photographs. The high-resolution transmission electron microscopy (HRSEM) instrument used was AURIGA (FIB-FESEM) de Carl Zeiss SMT Germany.

2.4. LASER CONFOCAL DIFFERENTIAL INTERFERENCE CONTRAST MICROSCOPY (LCM-DIM)

Laser confocal differential interference contrast microscopy (LCM-DIM) was used for *in situ* observation on a DFZ surface. This setup is build around a Confocal system (FV300, Olympus) attached to an inverted optical microscope (IX70, Olympus) with a 20× objective lens (LUCplan FLN 20x, Olympus) and equipped with a Nomarski prism introduced into the optical path and a partially coherent superluminescent diode (Amonics Ltd., model ASLD68-050-B-FA: 680 nm) to eliminate diffraction noise. The observation cell ($1 \times 10 \times 15$ mm³, volume = 150 µL) used in this work was made out of two sandwiched glass plates of 0.17 mm thickness separated by 1 mm thick polystyrene spacers glued by silicone adhesive to one of the glass plates. Previously grown seed crystals of DFZ and saturated solution of DFZ were transferred to the observation cell.

2.5. X-RAY CRYSTAL DIFFRACTION (XRCD)

Face indexing was performed by crystal shape modelling by interactive use of video pictures of the crystal using the 'Crystal Faces' Plugin in the Bruker Apex2 software suite. Mercury software was used to stereoview of DFZ molecular packing.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The mechanism of DFZ crystal growth surface was evaluated by optical microscopy, SEM and LCM-DIM. Video *in situ* by optical microscopy and images suggests that diffusion surface is in spiral growth due observed steps emerging on the growing crystal surfaces. The SEM analysis revealed regular spaced growth spiral steps, as show in Figure 1I. For crystal growth the important feature of the emergent step is that it extends over only a part of the surface and during growth winds up into a spiral to create a growth hillock (DAVEY; GARSIDE, 2002). LCM-DIM which, given the fast scan rates, large scanning area and medium lateral resolution is ideal to probe microscopic kinetic surface phenomena. *In situ* LCM-DIM demonstrates that DFZ hollow crystal growing in hillock spiral (Figure 2), confirming results observed by optical microscopy and SEM.

According Sunagawa crystal growth takes place uniquely at solid–liquid interfaces. Depending on the atomic structure of the solid–liquid interface, the growth mechanisms and normal growth rate R versus driving force $\Delta\mu/(kBT)$ relations are different, resulting in different morphology. It has been well established that there are three growth mechanisms: an adhesive-type, two-dimensional nucleation (2-DNG) or a spiral growth, as demonstrated in Figure 3 (CUBILLAS; ANDERSON, 2010; SUNAGAWA, 2010).

Oaki &Imai experimentally demonstrated the systematic variation of crystal morphology and these changed from specific polyhedral habits into various dendritic forms evaluating growth rate versus driving force. Polyhedral forms were changed into hopper morphology due of Berg effect while the formation of dendrites was ascribed to instability of growing surface through diffusion-limited process (OAKI; IMAI, 2003).

Crystals of DFZ were collected at various stages of antisolvent crystallization and observed by SEM, which allowed visualizing the different morphologies formed as driving force increased, as shown in Figure 1. Hollow crystals initially nucleate as polyhedral shape with display well-defined faces (Figure 1A) and this is located in the region (a) of the Figure 2 described by Sunagawa (2010). Hopper shape can be visualized in Figure 1B and 1C. The peculiarity of hopper crystals is that the top is not limited by well-defined faces containing a cavity which is typical of hopper crystals (FAURE et al., 2003). Due to the presence of the Berg effect a crystal takes a hopper form under the driving force

condition between $\Delta\mu/(kBT^*)$ and $\Delta\mu/(kBT^{**})$ as shown in Figure 2 (SUNAGAWA, 2010). Berg effects leads to the formation of hopper (OAKI; IMAI, 2003) due higher driving force along the edges or corners of a face on a polyhedral crystal than at the center of the face, growth layers originate near the edges and corners and advance inwards to the center of the face (BERG, 1938). Berg effect thus can explain the formation of DFZ hopper crystal. Figures 1D, E, F, G shown de hollow crystal with a solid portion at crystal center and hourglass cavity with a V-shape. The morphology of the cavity corresponds to a concentric stair-like microstructure as shown in Figure 1F and 1G. Optical microscopy and video *in situ* also demonstrated that hollow crystal initially nucleate as solid block, as shown in Figure 4 A and B, however it was gradually converts into a hollow crystal (Figure 4C, D, E, F).

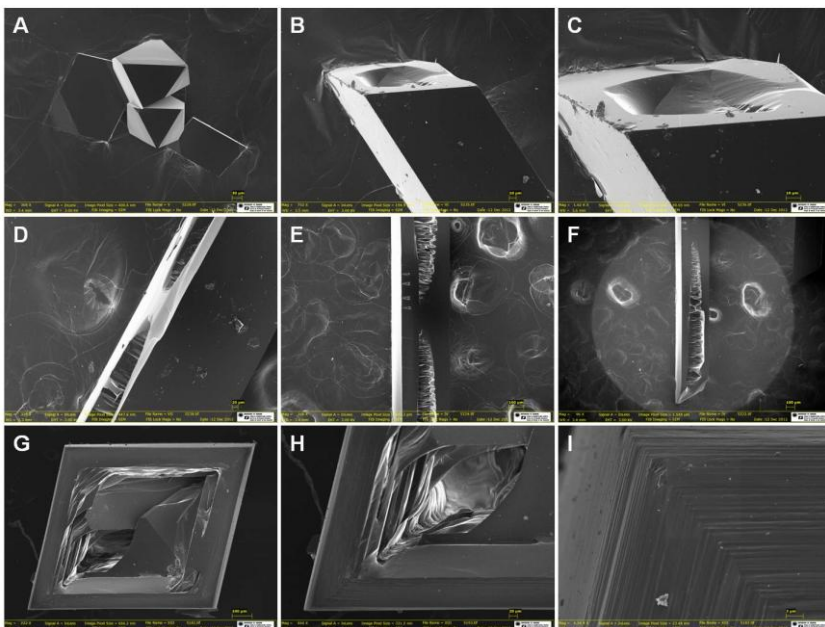


Figure 1: Scanning electron micrographs of tubular crystals of DFZ crystallized by DFZ-MeOH (25 mg/mL):water (1:½): (A) Solid starting crystal growth; (B) and (C) the onset of hollow crystal by Berg Effect; (D), (E) and (F) inside of the crystal; (G), (H) and (I) hollow features in the (100) face.

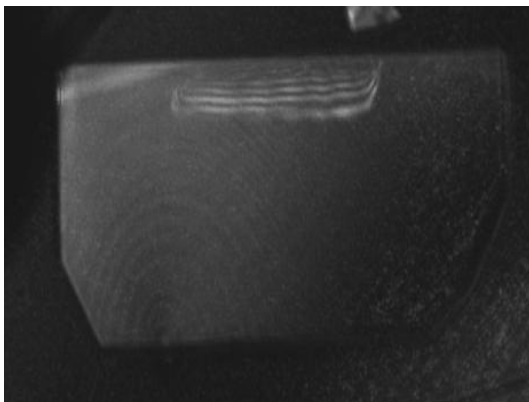


Figure 2: Step morphology of spiral hillocks of DFZ crystal by LCM-DIM

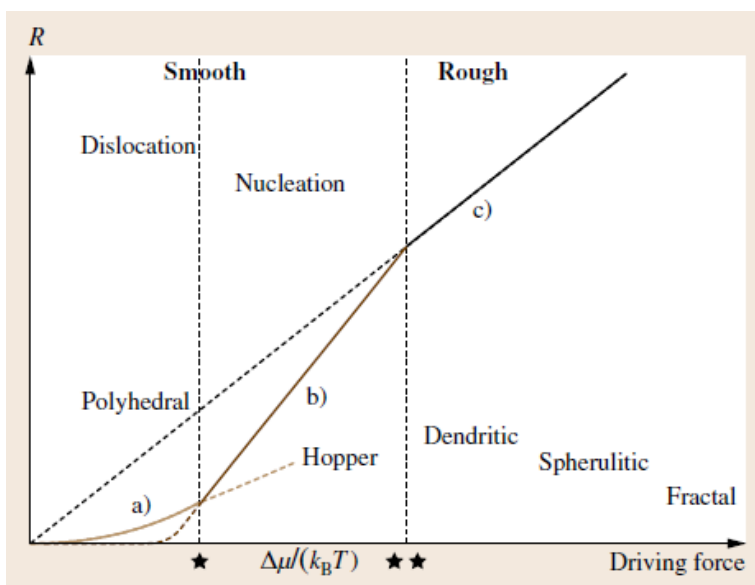


Figure 3: Schematic illustration of the morphological evolution of a crystal on a normal growth rate R versus driving force $\Delta\mu/(k_B T)$ diagram. Curve (a) corresponds to spiral growth mechanism, curve (b) to 2DNG, and curve (c) to adhesive-type growth mechanism. Two critical driving forces $\Delta\mu/(k_B T^*)$ and $\Delta\mu/(k_B T^{**})$ are shown for one crystallographic face, and the regions where polyhedral, skeletal, dendritic, spherulitic, and fractal morphologies are expected are indicated (SUNAGAWA, 2010).

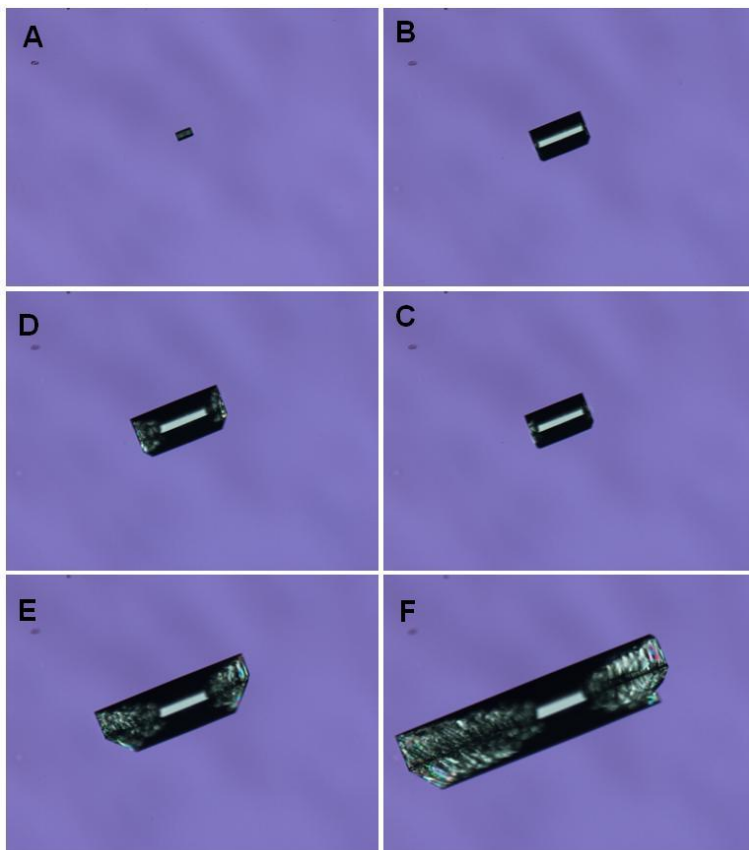


Figure 4: (A-F) Polarized light microscopy image of growth sequence of hollow crystal DFZ at the following conditions: DFZ-MeOH 25 mg/mL; water (1:½) in open crystallizer.

Spiral growth is a mechanism that is expected only on smooth interfaces (SUNAGAWA, 2005). Polyhedral, hopper shape and spiral growth DFZ shown that it correspond to spiral growth mechanism of curve (a) in Figure 2, however hollow formation still not clear.

Diffusion-limited crystal growth has been described for other drugs (EDDLESTON; JONES, 2010), however occur on rough interfaces, as shown in Figure 2 (OAKI; IMAI, 2003; SUNAGAWA, 2010). This could explain DFZ hollow crystal formation; however no DFZ dendrites were formed during crystallization process. Possibly,

hollow crystals growth are located between hopper and the start of diffusion-limited growth ($\Delta\mu/(kBT^{**})$) as show in Figure 5.

The growth mean rates, size and ratio a/b of hollow crystal is show in Figure 6A, B, C respectively and there was an increase of these parameters. The mean crystal growth rate of hollow crystal portion was 14.35 $\mu\text{m}/\text{min}$ while solid portion was 2.83 $\mu\text{m}/\text{min}$. Crystal size (μm) of started hollow crystal portion also is similar in all evaluated samples, with an average of 113 μm (length) and 68 μm (width). The faster hollow growth and increased in ratio a/b demonstrate that has an anisotropy. Some factors induced anisotropy such as flows in solution, convection, difference in surface tension and concentration difference (SUNAGAWA, 2005). In this case Berg effect is responsible for anisotropy. The two key factors in the growth of hollow crystal by diffusion-limited mechanism are highly anisotropy and high supersaturation levels (EDDLESTON; JONES, 2010), however for enough growths, underlying rigid anisotropy, meaning discrete favored directions, can be crucial for the large scale morphology (BALL et al., 1989). It has been confirmed that the degree of the Berg effect varies due to the flow rate of the solution over a crystal face, and that the difference in the driving force between the edges and the center of a face becomes smaller as the flow rate increases (SUNAGAWA, 2005). Taking the Berg effect into account Kuroda et al demonstrated that the boundary between the area where the polyhedral morphology remains stable and the region where the stability is violated, and hopper or dendritic forms appear, will change depending on crystal size (KURODA et al., 1977). These explain anisotropy of DFZ hollow crystal with formation of well defined crystals and demonstrate that growth is not by diffusion-limited.

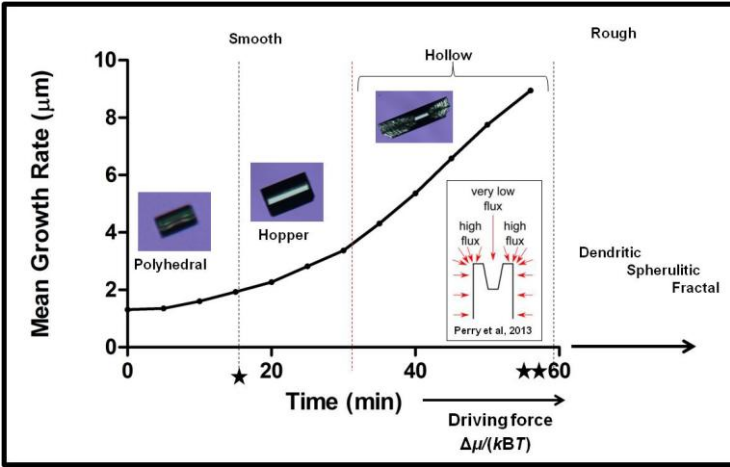


Figure 5: Schematic illustration of the morphological evolution of a crystal on a mean growth rate (face 100) of DFZ versus time (driving force $\Delta\mu/(kBT)$ diagram on spiral growth. Two critical driving forces $\Delta\mu/(kBT)^\star$ and $\Delta\mu/(kBT)^{\star\star}$ are shown, and the regions where polyhedral, hopper (Berg effect) and hollow morphologies were found are indicated.

Perry et al studied salicylic acid hollow crystal formation and demonstrated that these features are a direct consequence of differential flux across the one of the face with the edges experiencing a much higher diffusive flux than the center position. Ultimately this leads to preferred growth at the edges compared to the center, causing the formation of a hollow feature (PERRY et al., 2013). This can explain the hollow crystal formation and Figure 6 proposes one new region before limited-diffusion for DFZ hollow crystal.

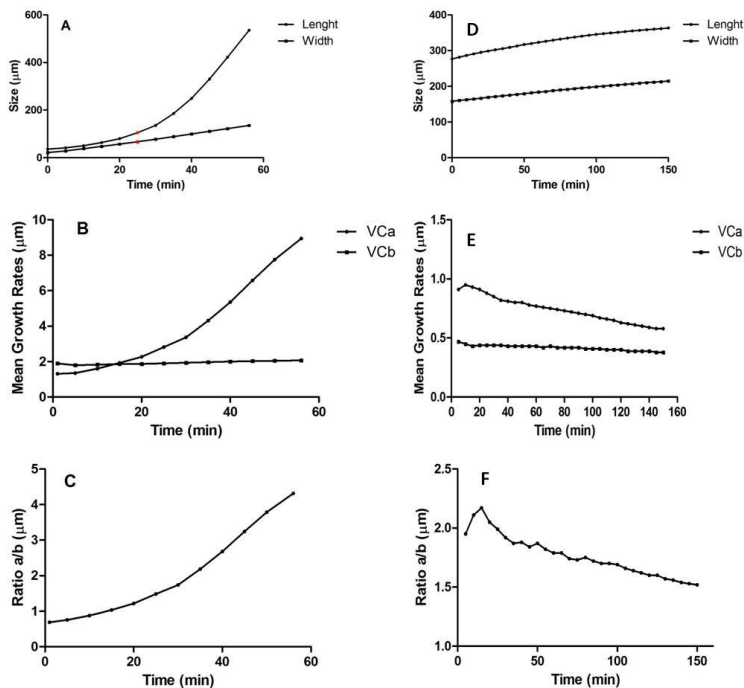


Figure 6: (A) Crystal size, (B) Mean growth rate and (C) ratio a/b of hollow crystal obtained in open crystallizer; (D) Crystal size, (E) Mean growth rate and (F) ratio a/b of solid crystal obtained in closed crystallizer, by antisolvent crystallization of DFZ-MeOH 25 mg/mL:water (1:1/2).

The mechanism of diffusion species between the bulks solutions were evaluated using antisolvent method. Hollow crystal of DFZ was obtained by this method using only one concentration (PAULINO et al., 2013). Concentrations above and below were evaluated and also formed hollow crystal, despite, in lower concentration the crystal presented a more irregular shape (data not show). Supersaturation is the key driving force in crystallization process determining nucleation and growth (BARRETT et al., 2010). Antisolvent crystallizations need some criterions such the solute has a high solubility in the initial solvent, is almost non soluble in the final solvent, the two solvents are fully miscible and the product crystallizes immediately in the antisolvent phase (MALLET et al., 2004). DFZ is soluble in methanol and insoluble in water. In order to understand the effect of water in this crystallization

process the solubility of supersaturated solution of DFZ in pure methanol and different proportions of methanol:water (1:0; 1: $\frac{1}{2}$; 1:1; 1:2; 1:3) were evaluated. Figure 7 demonstrate that an increase on the amount of water lead to a decrease in DFZ solubility.

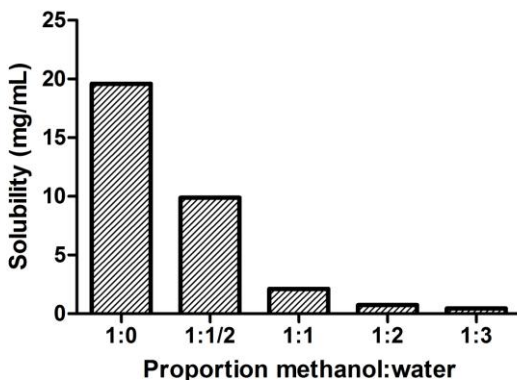


Figure 7: DFZ Solubility of supersaturated solution using different proportions of methanol:water (1:0; 1: $\frac{1}{2}$; 1:1; 1:2; 1:3).

In the antisolvent method, DFZ solubility decreased was triggered by addition of water leading to an increase in supersaturation and consequently an increase of driving force. This explains the intense and quick crystallization (Figure 8B, C, D) in proportion 1:1, 1:2 and 1:3 (DFZ-MeOH:water) respectively. Formation of whiskers can be seen in these conditions and their origins are the high driving force and strong anisotropy involved in either environmental conditions (SUNAGAWA, 2005). However, in condition of 1: $\frac{1}{2}$ (DFZ-MeOH:water), show in figure 8A, crystallization was slower suggesting that driving force also depends on the rate of methanol evaporation, taking more time to nucleation with formation of single crystal.

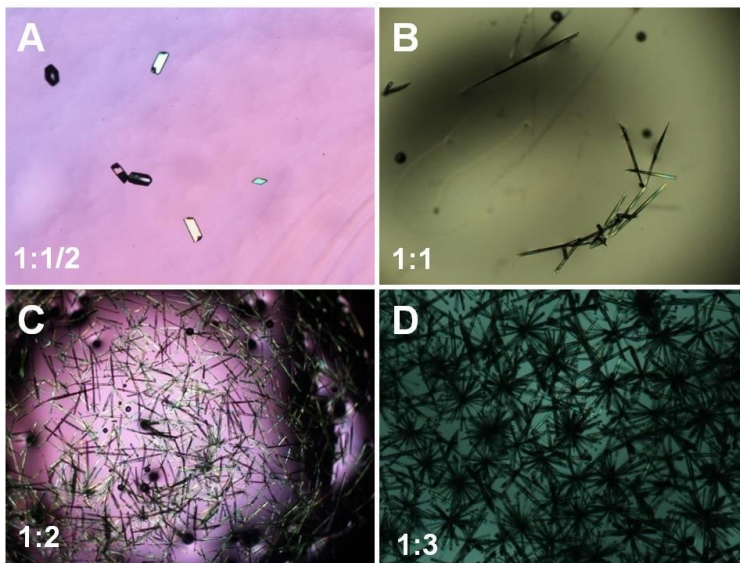


Figure 8: Polarized light microscopy image of DFZ crystals obtained by antisolvent crystallization of DFZ-MeOH (25 mg/mL):water in the following proportion: (A) 1:½; (B) 1:1; (C) 1:2 and (D) 1:3 in open crystallizer.

Solid nucleation of hollow crystal can be explained by the low initial driving force, which is controlled by antisolvent and methanol evaporation. This maintains a uniform growth rate on the crystal surface. The increase in the driving force and Berg effect leads to the beginning of the growth hollow crystal. At this stage, the edges of (100) face start to grow preferentially and slowing growth at the center. The orientation of DFZ hollow crystal represented in Figure 9 was determined by X-ray crystal diffraction, to elucidate the crystal faces. The extremity of tubular hollow crystal are formed by (100) face while the other are (0-11) and (012) faces. Stereoview showing the molecular packing of plane (100) of DFZ hollow crystal are demonstrating in Figure 10, and shows how the molecules are packed at this face. The three C-H \cdots N bonds raise the E ring can be seen in the crystal face (100), forming a holder or the finger that serve as fitting for other molecules. The region of the ring A fits perfectly in this holder, thus forming crystal packing with molecular structure stabilized by short contacts. Packaging of this face contributed to crystal growth rate in direction of (100) face, forming the hollow crystal. Cuffini et al demonstrated that molecular structure of DFZ is stabilized by H-bonds

and short contacts, which give rise to a very close packing arrangement and can be imagined based on semi open left hand in which the thumb is formed by the E ring and the index finger by the A ring. The three C–H ···N bonds raise the E ring, aligning it almost perpendicular to the steroid skeleton. Intermolecular contacts are responsible for this molecular conformation (CUFFINI et al., 2007).

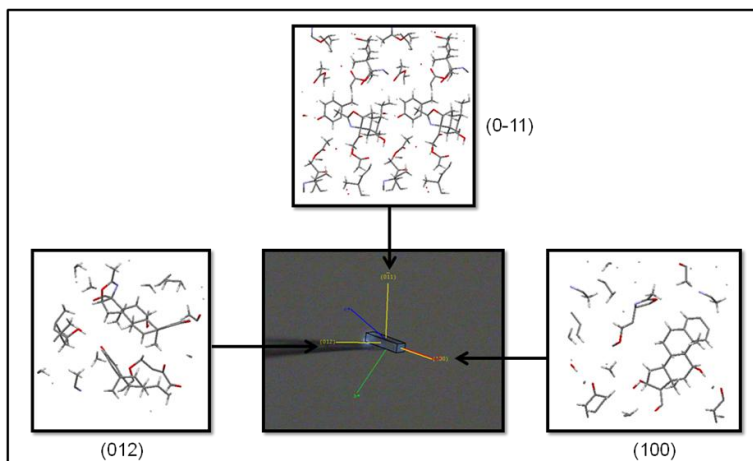


Figure 9: Morphology of Deflazacort hollow crystal with the defining exposed crystal planes labeled.

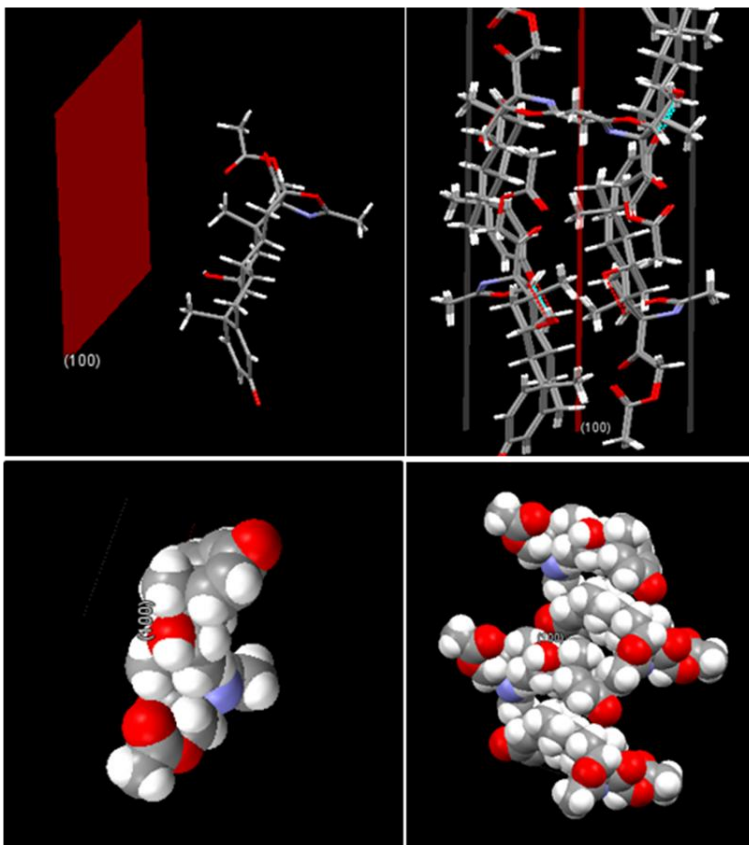


Figure 10: Stereoview showing the molecular packing of plane (100) of DFZ hollow crystal.

Closed crystallizer was used to prevent solvent evaporation and only polyhedral crystals were obtained (Figure 11). Solid crystal, in contrast of hollow crystal, showed a slow increase in size and a decrease in growth rate and ratio a/b (Figure 5D, E, F). The solid crystal size was $363.5 \mu\text{m} \times 214.9 \mu\text{m}$ and the mean growth rate was $0.58 \mu\text{m}/\text{min}$ (length) and $0.38 \mu\text{m}/\text{min}$ (width). In this situation crystal flat faces are growing under conditions of surface kinetics control (NANEV, 2000), thus explaining the formation of solid crystals with antisolvent method and controlled evaporation. These results confirm that the evaporation rate is necessary so that the system reaches quickly the right point of saturation. Literature show that solvent, crystallization temperature, evaporation rate and stirring can modify the crystallization kinetics and

give a high supersaturation levels (EDDLESTON; JONES, 2010). A mixture of hollow crystals and solid crystals were observed when stirring were used during antisolvent crystallization process of DFZ (PAULINO, et al., 2013). Stirring reduces or eliminates the concentration gradients across growing crystal faces that are necessary for hollow crystal formation. These results demonstrated that a suitable saturation, solvent evaporation and Berg effect is required to obtain DFZ hollow crystal.

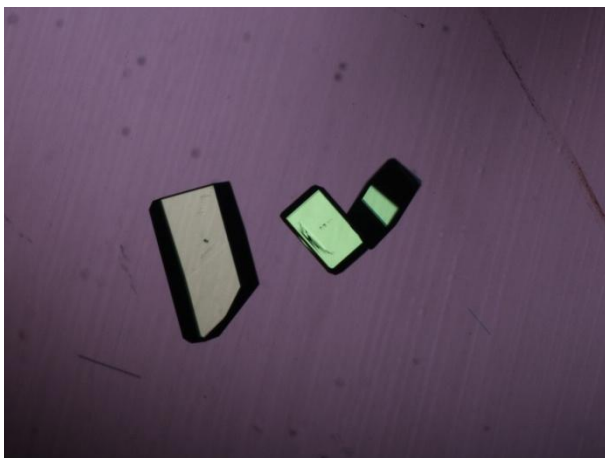


Figure 11: Polarized light microscopy image of DFZ crystals obtained by antisolvent crystallization of DFZ-MeOH (25 mg/mL):water (1:½) in closed crystallizer.

To verified if hollow crystal are formed only in methanol, DFZ-MeOH solutions in different concentrations were maintained in closed glass vial, at ambient temperature and showed no crystallization at concentrations of 12.5 and 25 mg/mL, however solid crystal were formed at concentrations of 35, 45 and 60 mg/mL, as demonstrate in Figure 12A, B and C respectively. Hollow crystal of DFZ-MeOH (25, 35, 45 and 60 mg/mL) were formed when solutions were maintained in open crystallizer at 40°C, as showed in Figure 12 D, E, F and G respectively. Temperature led to an increase of evaporation rate and consequently increased the driving force. These results demonstrated the hollow crystal formation is dependent of driving force and that also is possible obtain this morphology by evaporation method.

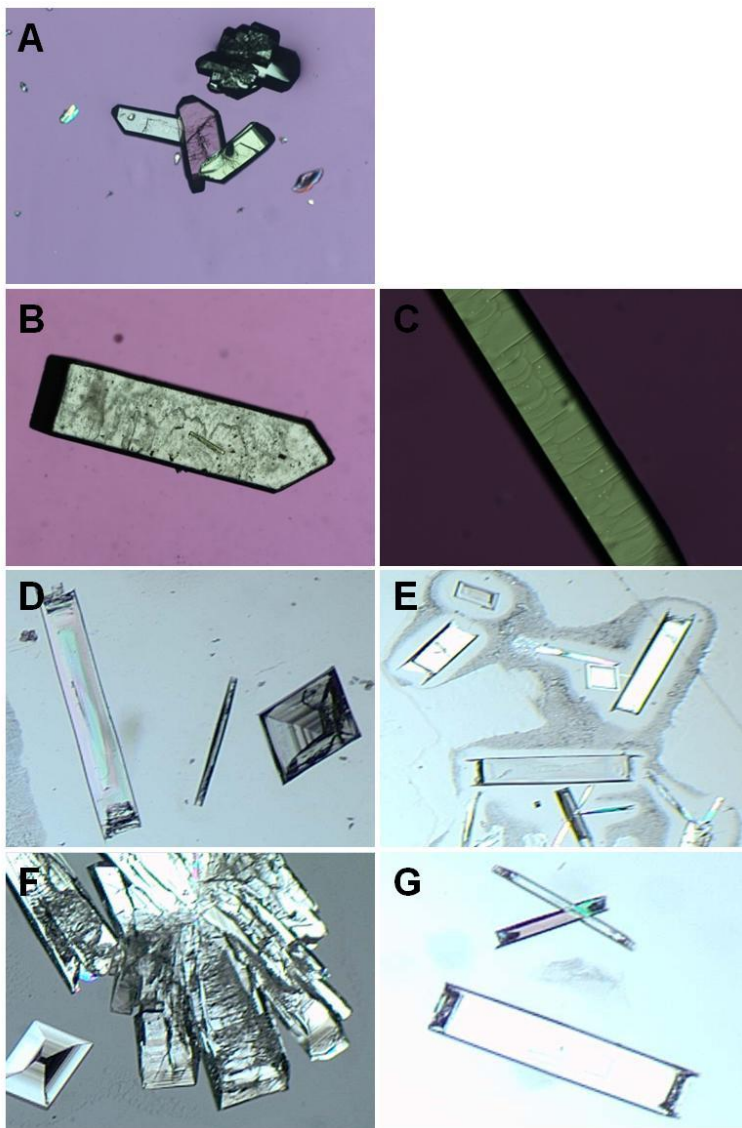


Figure 12: Polarized light microscopy image of DFZ crystals obtained by DFZ-MeOH crystallization. Closed glass vial: (A) 35 mg/mL; (B) 45 mg/mL; (C) 60 mg/mL. Open crystallizer: (D) 25 mg/mL; (E) 35 mg/mL; (F) 45 mg/mL; (G) 60 mg/mL.

4. CONCLUSIONS

This study shown that spiral growth is the main mechanism and Berg effect has a pronounced effect on surface kinetics and ultimately surface morphology of DFZ. Sizes of started hollow crystal growth also contribute for this conclusion, since in all analyzed samples it showed similar width and length. These results propose that hollow crystals are formed between the end of the Berg effect and the beginning of the diffusion-limited crystallization.

Results found with DFZ hollow crystal demonstrated that it grows anisotropically, with the growth rate of the (100) face, several times greater than that of the other surfaces. Amount of water and driving force are important factors in the growth of hollow crystal since changed the crystallization rate, which is the key factor in the growth of hollow crystal.

Hollow crystal also were obtained by evaporation method using only methanol, however it was necessary a temperature increase to modify evaporation rate, driving force and consequently the growth rate. Solid crystals were formed with a decrease in growth rate. This shows the importance of the growth rate in the hollow crystals formation.

Antisolvent technique to obtain hollow crystal is important and presented some advantages, involving a straightforward method which is rapid and easy to perform in contrast of evaporation method.

The present study contributes to understanding the crystallization process and the growth mechanism of DFZ hollow crystal, and enriches our knowledge in field of pharmaceutical hollow crystal. This work may add to obtain hollow crystal of other poorly soluble drugs, will thus lead to an increased in the dissolution rate and better absorption.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank CNPq and CAPES for financial support and student fellowships. Silvia L. Cuffini thanks CAPES for a Visiting Professor grant and CONICET Argentina for fellowships. The authors would like to thank LDRX-UFSC for technical support during the X-ray diffraction analysis and Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC) for SEM measurements. The authors would also like to thank Laboratorio de Estudios Cristalográficos and the University of Granada, Spain.

REFERENCES

BALL, R. C.; BLUNT, M. J.; SPIVACK, O. R. Diffusion-controlled growth. **Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences**, v. 423, p. 123-132, 1989.

BARRETT, M.; MCNAMARA, M.; HAO, H.; BARRETT, P.; GLENNON, B. Supersaturation tracking for the development, optimization and control of crystallization processes. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 88, n. 8, p. 1108-1119, ago 2010.

BERG, W. F. Crystal Growth from Solutions. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 164, p. 79-95, 1938.

BOGOYAVLENSKIY, V.; CHERNOVA, N. Diffusion-limited aggregation: A relationship between surface thermodynamics and crystal morphology. **Physical review E**, v. 61, n. 2, p. 1629-33, fev 2000.

CUBILLAS, P.; ANDERSON, M. W. **Zeolites and Catalysis: Synthesis, Reactions and Applications**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010. p. 881

CUFFINI, S.L.; ELLENA, J.F.; MASCARENHAS, Y.P.; AYALA, A.P.; SIELSER, H.W.; FILHO, J.M.; MONTI, G. A.; AIASSA, V.; SPERANDEO, N.R. Physicochemical characterization of deflazacort: thermal analysis, crystallographic and spectroscopic study. **Steroids**, v. 72, n. 3, p. 261-9, mar 2007.

DAVEY, R. J.; GARSIDE, J. **From molecules to Crystallizers**. Second ed. USA: [s.n.], 2002. p. 79

DETTE, S. S.; STELZER, T.; JONES, M. J.; ULRICH, J. Dehydration behaviour of hydrates. **Crystal Research and Technology**, v. 45, n. 7, p. 697-702, 23 abr 2010.

DETTE, S.S.; STELZER, T.; JONES, M.J.; COQUEREL, G.; ULRICH, J. Fascinating control of crystalline microstructures. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 88, n. 9, p. 1158-1162, set 2010.

DETTE, SEVERINE S; STELZER, TORSTEN; RO, E.; JONES, MATTHEW J; ULRICH, JOACHIM. Controlling the Internal Diameter of Nanotubes by Changing the Concentration of the Antisolvent 2007. **Crystal Growth & Design**, v. 7, p. 7-9, 2007.

EDDLESTON, M. D.; JONES, W. Formation of Tubular Crystals of Pharmaceutical Compounds. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 1, p. 365-370, 6 jan 2010.

FAURE, F.; TROLLIARD, G.; NICOLLET, C.; MONTEL, J.-M. A developmental model of olivine morphology as a function of the cooling rate and the degree of undercooling. **Contributions to Mineralogy and Petrology**, v. 145, n. 2, p. 251-263, 26 mar 2003.

GREER, H.; WHEATLEY, P. S.; ASHBROOK, S. E.; MORRIS, R. E. Early Stage Reversed Crystal Growth of Zeolite A and Its Phase Transformation to Sodalite. **Journal of the American Chemical Society**, n. 13, p. 17986-17992, 2009.

JOSHI, N.; RAJESHWARI, K. Deflazacort. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 55, n. 4, p. 296-300, 2009.

KURODA, T.; IRISAWA, T.; OOKAWA, A. GROWTH OF A POLYHEDRAL CRYSTAL FROM SOLUTION AND ITS MORPHOLOGICAL STABILITY. **Journal of Crystal**, v. 42, p. 41-46, 1977.

MALLET, F.; PETIT, S.; LAFONT, S.; BILLOT, P.; LEMARCHAND, D.; COQUEREL, G. Crystal Growth Mechanism in a Solution of Hollow Wiskers of Molecular Compounds. **Crystal Growth & Design**, v. 4, n. 5, p. 965-969, 2004.

MARTINS, D.; STELZER, TORSTEN; ULRICH, JOACHIM. Formation of Crystalline Hollow Whiskers as Relics of Organic

Dissipative Structures b b. **Crystal Growth & Design**, v. 11, p. 3020-3026, 2011.

MOREIRA, M. L.; ANDRÉS, J.; MASTELARO, V. R.; VARELA, J. A.; LONGO, E. On the reversed crystal growth of BaZrO₃ decaoctahedron: shape evolution and mechanism. **CrystEngComm**, v. 13, n. 19, p. 5818, 2011.

NANEV, C. N. Polyhedral (in-) stability by increasing supersaturation—maximum rate of stable growth. **Journal of Crystal Growth**, v. 212, n. 3-4, p. 516-521, maio 2000.

OAKI, Y.; IMAI, H. Experimental Demonstration for the Morphological Evolution of Crystals Grown in Gel Media. **Crystal Growth & Design**, v. 3, n. 5, p. 711-716, set 2003.

PAN, X.; AI, F.; JIN, W.; LIU, Y.; ZHANG, Y. Morphologies of solid-liquid interface and surface steps during rapid growth of BaB₂O₄ single crystals. **Science in China Series G: Physics, Mechanics and Astronomy**, v. 50, n. 4, p. 539-545, ago 2007.

PAULINO, A.S.; RAUBER, G.; CAMPOS, C.E.M.; MAURÍCIO, M.H.P.; DE AVILLEZ, R.R.; CAPOBIANCO, G.; CARDOSO, S.G.; CUFFINI, S.L. Dissolution enhancement of Deflazacort using hollow crystals prepared by antisolvent crystallization process. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 2, p. 294–301, 13 maio 2013.

PAULINO, A.S.; RAUBER, G.S.; CAMPOS, C.E.M.; MAURÍCIO, M.H.P.; DE AVILLEZ, R.R.; CUFFINI, S.L.; CARDOSO, S.G. Hollow crystal anti-solvent preparation process as a promising technique to improve dissolution of poorly soluble drugs. **Journal of Crystal Growth**, v. 366, p. 76–81, mar 2013.

PERRY, A. R.; PERUFFO, M.; UNWIN, P. R. Quantitative Plane-Resolved Crystal Growth and Dissolution Kinetics by Coupling *In situ* Optical Microscopy and Diffusion Models: The Case of Salicylic Acid in Aqueous Solution. **Crystal Growth & Design**, v. 13, n. 2, p. 614-622, 6 fev 2013.

POODT, P.W.G.; HEIJNA, M.C.R.; SCHOUTEN, A.; GROS, P.; VAN ENCKEVORT, W.J.P.; VLIEG, E. Simple Geometry for Diffusion Limited Protein Crystal Growth: Harnessing Gravity to Suppress Convection. **Crystal Growth & Design**, v. 9, n. 2, p. 885–888, 4 fev 2009.

SANDER, J. R. G.; BUČAR, D.-K.; BALTRUSAITIS, J.; MACGILLIVRAY, L. R. Organic nanocrystals of the resorcinarene hexamer via sonochemistry: evidence of reversed crystal growth involving hollow morphologies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 16, p. 6900-3, 25 abr 2012.

SAVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug solubility: importance and enhancement techniques. **ISRN Pharmaceuticals**, v. 2012, p. 1-10, jan 2012.

SCREMIN, A.; PIAZZON, M.; SILVA, M.A.S.; KUMINEK, G.; CORREA, G.M.; PAULINO, N.; CARDOSO, S.G. Spectrophotometric and HPLC determination of deflazacort in pharmaceutical dosage forms. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, p. 281–287, jun 2010.

SUNAGAWA, I. **Crystals Growth, Morphology and Perfection**. 1. ed. New York: Cambridge University Press, 2005. p. 295

SUNAGAWA, I. Single Crystal Grown Under Unconstrained Conditions. **Springer Handbook of Crystal Growth**. 1. ed. New York: [s.n.], 2010. p. 133-157.

YANG, X.; FU, J.; JIN, C.; CHEN, J.; LIANG, C.; WU, M.; ZHOU, W. Formation mechanism of CaTiO₃ hollow crystals with different microstructures. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 40, p. 14279–87, 13 out 2010.

ZHOU, W. Reversed Crystal Growth : Implications for Crystal Engineering. **Advanced Materials**, v. 22, p. 3086-3092, 2010.

**CAPÍTULO 5: ARTIGO 4 - DEFLAZACORT HOLLOW
CRYSTAL: ANTI-INFLAMMATORY EFFECT AND STABILITY**

APRESENTAÇÃO

O estudo do método de obtenção de cristais ocos, a caracterização, o desempenho de dissolução e o mecanismo de crescimento contribuíram para o entendimento da obtenção e das vantagens deste novo hábito cristalino, principalmente no estudo de dissolução. Os cristais ocos de DFZ apresentaram um melhor desempenho de dissolução que a matéria-prima micronizada e não micronizada.

O DFZ é um glicocorticóide com propriedades anti-inflamatórias e estudos *in vivo* demonstraram uma diminuição significativa do edema no modelo de edema de pata induzido por carragenina. Este modelo foi utilizado neste trabalho com o objetivo de avaliar cápsulas contendo de DFZ micronizado, não micronizado ou cristais ocos podendo assim contribuir para uma avaliação do impacto da matéria prima micronizada e dos diferentes hábitos cristalinos neste modelo de inflamação.

Os glicocorticoides são sensíveis à hidrólise e radiação UV. A estabilidade dos glicocorticoides tem sido amplamente estudada em diversas condições, no entanto há poucos estudos em relação ao estado sólido. O hábito cristalino está relacionado à forma externa do cristal e este por sua vez pode ter um impacto na estabilidade, levando a necessidade de um estudo de estabilidade dos cristais ocos de DFZ, comparados ao hábito cristalino não micronizado e matéria prima submetida ao processo de micronização.

De acordo com o ICH, o produto de degradação pode ser considerado como uma impureza e deve ser qualificado através da aquisição e avaliação da segurança biológica destas impurezas. Para complementar este estudo foram realizados ensaios biológicos *in vitro*, com o objetivo de avaliar o efeito do DFZ fotodegradado na citotoxicidade e na supressão de genes da inflamação.

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos com: avaliação *in vivo*, utilizando cápsulas contendo diferentes hábitos cristalinos de DFZ; resultados de estabilidade dos diferentes hábitos frente à luz e temperatura/umidade e avaliação *in vitro* do DFZ fotodegradado.

Deflazacort hollow crystal: anti-inflammatory effect and its stability

Amarilis Scremin Paulino^a; Niraldo Paulino^b ; Ivair Donizeti Gonçalves^b; Suzana Diniz^b; Silvia L. Cuffini^{a,c} ; Simone Gonçalves Cardoso^a.

^a Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis, SC, Brasil.

^b Programa de Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Inovação em Saúde, Universidade Bandeirante de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

^c CONICET-CEPROCOR – MinCyT. Córdoba, Argentina

Corresponding author:

Amarilis Scremin

Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Farmácia. Campus Universitário - Trindade, Florianópolis, SC, Brasil. CEP 88.040-900

Fone (5548) 3721-4585

e-mail: amarilis_paulino@yahoo.com.br

ABSTRACT

Crystal habit has potentially significant contribution on the performance of crystalline drug, which has special relevance to BCS class II drugs that have solubility and/or dissolution limited oral bioavailability. Hollow crystal of Deflazacort (DFZ), a BCS class II anti-inflammatory drug, was obtained by antisolvent crystallization. Anti-inflammatory activity of hollow crystal was evaluated *in vivo* by paw oedema method. The results show that the treatment with DFZ hollow crystal (R4) promoted a further decrease on paw oedema in mice when compared to micronized (RM1) and crystalline (RM2) raw material. Stability of DFZ with different crystal (RM1, RM2 e R4) was performed in solid state under UV light (1.2 million lux/hour) or temperature and humidity (40 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ RH) conditions. Samples were characterized by HPLC, Differential scanning calorimetry (DSC), Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transformed Spectroscopy (DRIFT), X-Ray Powder Diffraction (XRPD). Photoproduct of hollow crystal was evaluated by LC/MS and ^1H NMR and was evaluated by *in vitro* biological assay, for assessing cytotoxicity and anti-inflammatory effect. Concerning to stability, the samples were stable when submitted to temperature and humidity, however, they were sensitive to UV light (1.2 million lux/hour). Hollow crystal (R4) had the highest percentage of photodegradation (about 73%). The results show that non-irradiated DFZ was more efficient than UV irradiated sample (R4) in decreasing the inflammatory effects during the evaluation in RAW 264.7. Furthermore, R4 was not able to reduce the expression of these enzymes. All results taken together suggest that irradiation of DFZ can produce change in the molecular structure and reduce its pharmacological effect. We have show that the steroidal skeleton was unaffected, but DFZ has 8 chiral centers suggesting isomerization or epimerization, forming a new chemical characteristic to DFZ, probably in the C11, and changing the points to interact with glucocorticoids receptor.

1. INTRODUCTION

Deflazacort (DFZ, Figure 1) is a glucocorticoid derivative of prednisolone with anti-inflammatory and immunosuppressive activity (JOSHI; RAJESHWARI, 2009). This drug has poor water solubility, and a critical problem associated with this sort of drug is their low and variable bioavailability derived from their slow dissolution and erratic absorption. A variety of approaches have been developed with a focus on enhancing the solubility, dissolution rate, and oral bioavailability of poorly water-soluble drugs (KAWABATA et al., 2011; PATIL et al., 2011) such as micronization, salt forms, solubilization of drugs in co-solvents among others.

Crystallization approach is another alternative, once the crystal size, habit and polymorphism can influence the physical and chemical properties of the solid (CHEN et al., 2011; GARCIA et al., 1999). Crystallization techniques are widely used in the pharmaceutical industry and antisolvent crystallization has been used to obtain ultrafine particles. The antisolvent crystallization process allowed the formation of hollow crystals, which demonstrated a better dissolution profile than the raw material (crystalline and micronized), making this a promising technique as strategy for improving the dissolution and thus the bioavailability of poorly water soluble drugs (PAULINO et al., 2013a). However, the impact of crystal habits on pharmacological effects of DFZ has not been evaluated yet. The treatment with DFZ decreased paw oedema in mice, suggesting an important effect on plasma extravasation (PAULINO et al., 2012). *In vitro* experiments demonstrated that DFZ decreased the nitric oxide level in the supernatant of RAW 264.7 macrophages (PAULINO et al., 2012). We can hypothesize that DFZ in RAW 264.7 cells inhibits the inducible NOS (iNOS) expression, the enzyme activity and the binding activity of NF- κ B, and that transfected cells inhibit iNOS promoter activity through its NF- κ B sites, similar to what has been reported for other corticoids (OPPONG et al., 2013). NF- κ B is involved in the control of inflammatory responses by interfering with the production of iNOS and the inducible isoform of cyclooxygenase COX-2 (CALIXTO et al., 2004).

The stability in solid state is also a topic of great interest because any degradation will usually adversely affect the therapeutic activity of drug. Glucocorticoids are a typical example of bichromophoric moiety: all possess an aliphatic ketone in the side chain linked to the position 17

of the D ring and ring A bears a keto group that is conjugated with either one or two double bonds, depending on the specific drug (CAFFIERI et al., 2008). Glucocorticoids are sensitive to hydrolysis and UV radiation (TØNNESSEN, 2004). The hydrolysis of DFZ takes place in the side chain linked to position 17 of the D ring and has been identified as 21-hidroxy-deflazacort (21-OH-DFZ). Pharmacological assays showed that both DFZ as 21-OH-DFZ are active in *in vivo* and *in vitro* inflammatory models, but 21-OH-DFZ is more potent than DFZ (SCREMIN et al., 2010). The photolysis of some corticoids has been studied in different conditions and environments. Cross-conjugated cyclohexenones and cyclohexadienones undergo the stereospecific “lumiketone” photorearrangement to bicyclohexanones. (CAFFIERI et al., 2008; MIOLO et al., 2009; SHIRASAKI et al., 2004; TENG et al., 2003; WILLIAMS et al., 1980). The photodegradation of hydrocortisone resulted in the formation of various products (CAFFIERI et al., 2008). Experiments on LPS-stimulated cellules showed loss of anti-inflammatory activity when Hydrocortisone 21-acetate was UVB-photodegraded in methanolic solution (CAFFIERI et al., 2008).

Despite the existence of several pharmacological studies with glucocorticoids, too little attention has been paid to show the impact of crystal habits on systemic drug efficiency in humans or animal models (MODI et al., 2013) or in the stability of drug. Then, the aim of this study was to investigate the influence of crystal habits of DFZ in anti-inflammatory activity and the stability of drug under light and temperature/humidity conditions

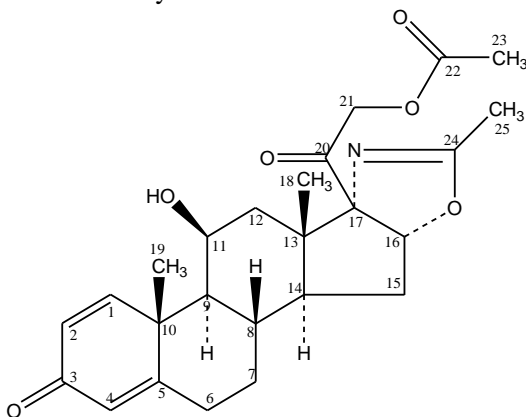


Figure 1: Chemical structure of Deflazacort

2. METHODOLOGY

2.1. MATERIALS

DFZ used as reference substance was obtained from Taizhou Taifa Pharma Co., Ltd, China and the raw materials were purchased from Brazilian suppliers and identified as: RM1 (micronized raw material) and RM2 (crystalline raw material). Hollow crystal of DFZ was obtained using the antisolvent according to method described by Paulino et al (2013) and was identified as R4.

2.2. *IN VIVO* ANTI-INFLAMMATORY BY PAW OEDEMA

Male Swiss mice (18 - 35 g) from Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia da Universidade Federal de São Paulo (CEDEME), housed at 22 ± 2 °C under a 12-12 h light-dark cycle, were used. Food and water were freely available. The animals were acclimatized to the laboratory for at least 1 h before testing and were used once throughout the experiments, which were carried out in accordance with current guidelines for the care of laboratory animals and the ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals from Ethical Committee UNIBAN (protocol nº 301_08) and Zimmermann (ZIMMERMANN, 1983). Measurement of paw oedema was performed according to Calixto et al (1991) with slight modifications (CALIXTO et al., 1991). Under slight anaesthesia with 2.2.2 tribromoethanol (0.12 g/kg), male Swiss mice received a 20 µl i.d. injection in one hind paw of phosphate buffered saline (composition mmol/l: sodium chloride - 137.0, potassium chloride - 2.7, and phosphate buffer - 10.0) containing carrageenan (300 µg/paw). The contralateral paw received 20 µl of saline and was used as the control. Animals were treated with mini drug delivery capsules of DFZ, using Harvard apparatus and methodology according to Lax et al (LAX et al., 1983). The mini capsules containing 3 mg of RM 1, RM 2 or R4 were administrated one hour before carrageenan-induced paw oedema. Oedema was measured by use of a plethysmometer (Ugo Basile) at several times at several time points (0 min to 90 min) after injection of the irritant. Oedema is expressed in ml as the difference between the test and control paws.

2.3. STABILITY STUDIES

Photostability were carried out by exposing the power DFZ samples (RM1I*, RM2 I* and R4 I*) to Philips UV lamp with a wavelength of 254 nm at an intensity of 1.2 million lux/hour. DFZ reference standard protected against light by aluminum foil was used as a dark control. The samples were also evaluated under temperature and humidity (40 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ RH). These studies were performed into a desiccator using saturated solution of NaCl. The samples were directly exposed to light or temperature/humidity in an open glass Petri dish. Samples were assayed for potency and solid state characterization at 0 (initial) and various time intervals from 1 to 6 months.

2.3.1. Chemical stability

Chemical stability of samples was evaluated by High-performance liquid chromatography and UV spectrophotometric evaluation.

High-performance liquid chromatography (HPLC) experiments were performed according validated method (PAULINO et al., 2012), on a Shimadzu system (Shimadzu, Japan) composed of an LC-10 AD_{VP} pump, an SCL-10 A_{VP} system controller, an SIL-10 AD_{VP} auto-injector and a degasser module. Data were acquired and processed using the Shimadzu CLASS-VP 5.032 software (Shimadzu, Japan). A C₁₈ (250 x 4.6 mm, i.d., 4 µm particle size) column was used (Luna Phenomenex, Torrance, CA - USA). The mobile phase consisted of water:acetonitrile (60:40, v/v), applied at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The injection volume was 20 µL and the detection wavelength was 244 nm. Assay was evaluated in triplicate. The samples were diluted mobile phase to the required concentration (30 µg mL⁻¹) and were injected into HPLC.

A Varian UV-VIS CARY spectrophotometer and a 10 mm quartz cell was used to obtain all spectral and absorbance measurements, using methanol to obtain final concentration of 12 µg mL⁻¹ (SCREMIN et al., 2010).

All samples solutions were protected from the light until analysis.

2.3.2. Solid state characterization

Differential scanning calorimetry (DSC) experiments were carried out with a Shimadzu DSC-60 calorimeter (Kyoto, Japan). The samples (~2mg) were weighed in an aluminum pan and scanned from 25

to 500 °C at heating rate of 10 °C min⁻¹ under dynamic N₂ atmosphere of 50 mL.min⁻¹.

Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transformed Spectroscopy (DRIFT) experiments were performed with a Shimadzu spectrometer, over a range of 3800–500 cm⁻¹, using KBr 1% (w/w).

X-Ray Powder Diffraction (XRPD) patterns were collected from a PANalytical X'PERT Multipurpose diffractometer equipped with a Cu K α source ($\lambda=1.5418^\circ\text{\AA}$) operated at 45 kV and 40 mA and angular scanning speed 2°min⁻¹. The specific conditions for DFZ were between 5° and 40° 2 θ , with step size 0.033°, 10 s per step. The cif files of Cambridge Structure Data (CSD) YEYYAD were used as reference material for polymorphic identification.

2.3.3. Characterization of the photoproduct of hollow crystal

High-speed HPLC/MS experiments were performed on a UFLC Prominence Shimadzu, using a C18 (100 x 2.1 mm, i.d., 1.9 μm particle size) column (Perkin Elmer, USA), mobile phase consisted of water:acetonitrile:formic acid (60:40:0.1, (v/v), applied at a flow rate of 0.1 mL min⁻¹. Mass spectrometry measurements (ESI-Q-TOF MS) were performed with a microTOF-Q II 10243 (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, USA) mass spectrometer. The electrospray ion source (ESI) was used to generate the ions operating in positive mode. The ESI-QTOF mass spectrometer was running at 4.5 kV at a desolvation temperature of 180 °C. The ESI-Q-TOF MS instrument was calibrated in the range m/z 50–3000 using a calibration standard (Low concentration tuning mix solution) which is supplied from Agilent Technologies (CA, USA). Data were processed via Bruker Data Analysis (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, USA) software version 4.0.

Nuclear Magnetic Resonance (¹H NMR) measured were carried out with a Bruker spectrophotometer (200 MHz). Samples were dissolved in CD₃OD.

2.4. *IN VITRO* BIOLOGICAL ASSAY

2.4.1. Cell culture: RAW 264.7 Macrophage

Mouse monocytic transformed cell lines mentioned by RASCHKE e colaboradores (1978) were cultivated in RPMI 1640 medium supplemented with sodium bicarbonate 2 gL⁻¹, streptomycin 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, penicillin 100UImL⁻¹ and 10% of fetal bovine serum. Cells were maintained at 37 °C and 5% of CO₂. The cell culture was used for

MTT Cell viability assay, gene expression quantification (Total RNA isolation), reverse transcription-polymerase chain reaction, quantitative PCR for iNOS and COX-2 transcript detection.

2.4.2. MTT - Cell viability assay

MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide) was used to measure macrophage (RAW 264.7) viability. Cells were seeded onto 96-well plates at a density of 1×10^4 cells/well, and incubated (37 °C, 5% CO₂) overnight. Then 2 µL of compounds in DMSO were added and the plates were incubated for 6, 12 and 24 hours. The concentration of non-irradiated R4 and irradiated R4 (R4 I*) were: 50, 100 and 300 µg mL⁻¹. After 6, 12 or 24h, the medium was replaced with a fresh medium (200 µL) containing MTT (0.5 mg mL⁻¹). The cells were then incubated for 4 h, the supernatant was collected, DMSO (200 µL) were added, shaking for 5 min until the crystals were fully dissolved. Absorbance was measured at 540 nm using a microplate reader (Labtech LT-4000 MS).

2.4.3. Gene expression quantification - Total RNA isolation

For RNA extraction, cells from RAW lineage were incubated with compounds (non-irradiated R4 or irradiated R4 I*) at the concentration of 50, 100 or 300 µg mL⁻¹ and stimulated with LPS (1 µg mL⁻¹) for another 24h at 37 °C, 5% CO₂. RNA was isolated from cultured cells using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The RNA quantity was assessed using nanodrop (NanoDrop Products, Wilmington, DE USA).

2.4.4. Reverse transcription-polymerase chain reaction

Complementary DNA (cDNA) was prepared with Reverse transcription (Fermentas), in a final volume of 50 µL, using 500 ng total of RNA, from cultured cells as described above, 400U of reverse transcriptase, 10 µL of enzyme buffer, 10 µL of 10 mM dNTP mixture (all from Invitrogen), 0.2 µL of oligo (dT) primer, and 50U of RNase inhibitor (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). This mixture was incubated at 42 °C, for 60 min, and then at 70 °C, for 10 min.

2.4.5. Quantitative PCR for iNOS and COX-2 transcript detection

Real-time PCR reactions of cDNAs were performed with SYBR Green I on an ABI PRISM Step one Sequence Detection System (PE Applied Biosystems). Quantification of transcripts iNOS and COX-2 were calculated as delta-delta C(T) method as previously described (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) and normalized by the amount of the beta-actin gene. Results were expressed as $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ from iNOS and COX-2 expression.

2.5. STATISTICAL ANALYSIS

The results are presented as mean \pm standard error. For *in vivo* studies the differences between the experimental groups were evaluated using analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test or by Student's t-test. For *in vitro* studies, the responses are expressed as the statistical difference between control and treatment groups. P values less than 0.05 were considered significant.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. EFFECT OF DEFLAZACORT AND ITS HOLLOW CRYSTAL ON INFLAMMATORY MODELS *IN VIVO*

Several studies have shown the effect of crystal habit in increasing dissolution rate of poorly soluble drugs. However, the impact of crystal habits on pharmacological properties of an active pharmaceutical ingredient (API) remains poorly understood. For this, the acute antiinflammatory effect of DFZ with different crystal habit was evaluated by carrageenan-induced hind paw edema. The results of the carrageenan-induced paw oedema test for DFZ hollow crystal (R4), micronized (RM1) and crystalline (RM2) raw material in the mice are presented in Figure 2. The results show that the treatment with R4 promoted a further decrease on paw oedema in mice when compared to RM1 and RM2 suggesting an important effect on plasma extravasation, that can contribute to a better anti-inflammatory effect. In this model, 3 mg of R4 (p.o) significantly inhibited oedema induced by carrageenan, with a maximal average inhibition of 40% after 60 min (Figure 3).

During tissue inflammation, there is normally vasodilation and recruitment of capillaries and at least transient increases in capillary permeability. This leads to the extravasation of plasma proteins and to tissue oedema. The application of proinflammatory substances may also change the interstitial structure, contributing to this oedema (CARLSSON; RIPPE, 1999).

Studies revealed wettability problems associated with the micronized raw material RM1. However, other factors affect the dissolution profile, such particle size, agglomeration, crystalline structure and morphology. The particle size and surface area affect the dissolution profile, although in the case of hollow crystals the dissolution may also be dependent on the wettability and morphology (crystal habit) (PAULINO et al., 2013).

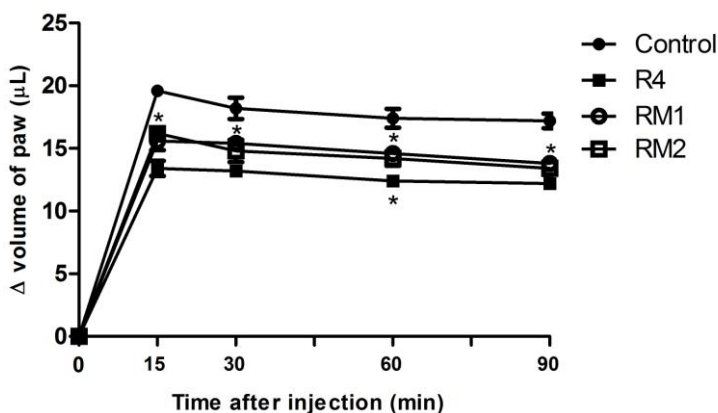


Figure 2: Effect of Deflazacort (DFZ) hollow crystal (R4), micronized (RM1) and crystalline (RM2) raw material (3 mg) in the paw oedema models induced by carageenan after 0 - 90 min to inflammatory induction. Each value represents the mean \pm S.E.M. of 6 animals, and asterisks (*) indicate significant inhibition of the paw weight in relation to the corresponding untreated groups (C), $P < 0.05$.

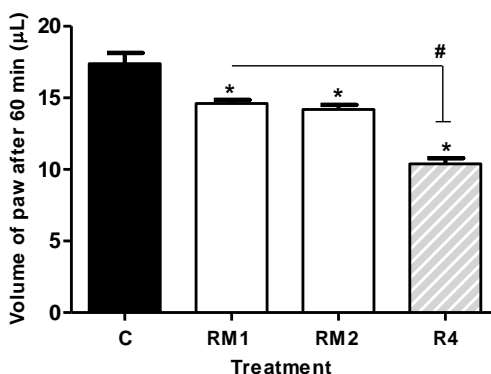


Figure 3: Effect of Deflazacort (DFZ) hollow crystal (R4), micronized (RM1) and crystalline (RM2) raw material (3 mg) in the paw oedema models induced by carageenan after 60 min to inflammatory induction. Each value represents the mean \pm S.E.M. of 6 animals, and asterisks (*) indicate significant inhibition of the paw weight in relation to the corresponding untreated groups (C), $P < 0.05$, and grade (#) indicate a significant statistical difference between RM 1 and R4, $P < 0.05$.

3.2. STABILITY STUDIES

The power physical appearance of samples starting, submitted to UV radiation (1.2 million lux/hour) or temperature/humidity (40 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ RH) conditions are show in Figure 4A, B and C respectively. It was assessed visually and photographed using a photographic camera. The non-irradiated samples and the samples submitted to temperature and humidity showed an uniform white color, while the irradiated samples showed a yellowish color. The color change demonstrated that possibly occurred a photodegradation.

Table 1: Experimental values obtained for the determination of Deflazacort (DFZ) after exposition to UV radiation and temperature/humidity.

| Samples | DFZ reference standard. Initial concentration. Percentage \pm SD (%) | UV irradiation (1.2 million lux/hour). Percentage \pm SD (%) | Temperature and humidity (40 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ RH, 6 months). Percentage \pm SD (%) |
|---------|---|--|--|
| RM1 | 100.3 ± 0.3 | 86.3 ± 0.1 | 101.5 ± 0.6 |
| RM2 | 99.9 ± 0.7 | 70.7 ± 0.4 | 100.5 ± 0.5 |
| R4 | 100.1 ± 0.5 | 27.1 ± 0.7 | 99.6 ± 0.9 |

SD = standard deviation; each value is the mean of three determination

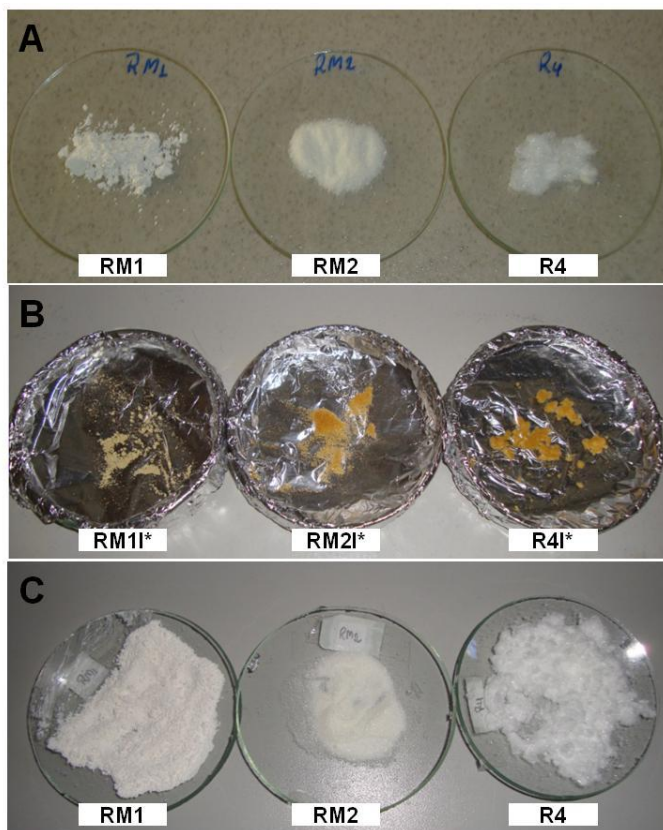


Figure 4: Photographs of deflazacort (DFZ) hollow crystal (R4), micronized (RM1) and crystalline (RM2) raw material samples: (A) non-irradiated; (B) UV irradiated (1.2 million lux/hour); (C) temperature and humidity ($40 \pm 2^\circ \text{C} / 75 \pm 5\% \text{ RH}$)/6 months.

The samples were followed by HPLC and UV spectrophotometry analyses. The chromatograms of irradiated samples shows the decrease of the peak corresponding to unmodified DFZ ($t_R = 12.4 \text{ min}$). However degradation peaks were not found in chromatograms (Figure 5) of irradiated samples. As show in Table 1, R4 presented the highest percentage of photodegradation (about 73%), followed by RM2 and RM1. No degradation was observed for samples submitted to temperature/humidity (chromatograms and UV spectra not shown).

The UV absorption spectrum of DFZ reference standard is characterized by a strong band around 244 nm with an absorbance measurement around 0.95 (Figure 2E) due to cross-conjugated dienone chromophore. The irradiated samples presented different absorbance measurements, as show in figure 5E. A slight reduction in absorbance measurement was observed for RM1 and RM2, while a strong decrease in spectral intensity was detected for R4. These results could suggest the disappearance of the chromophore group for R4.

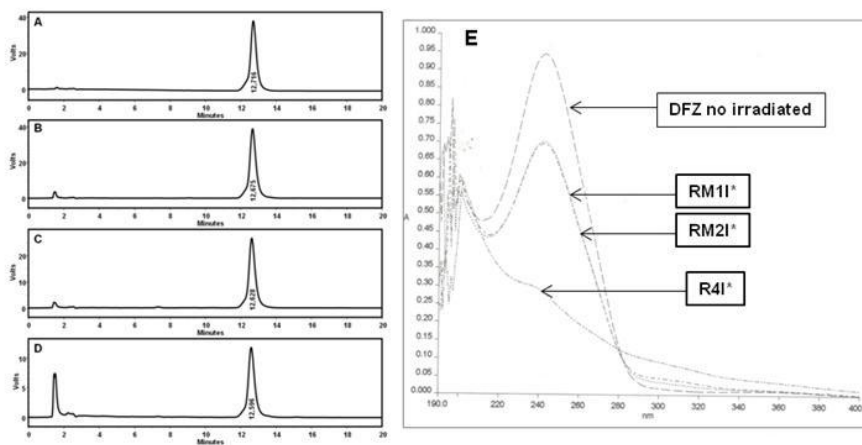


Figure 5: HPLC chromatograms of UV irradiated (1.2 million lux/hour) DFZ: (A) reference standard; (B) RM1I*; (C) RM2I*; (D) R4I*. Conditions: C₁₈ (250 x 4.6 mm, i.d., 4 μ m particle size) column, mobile phase consisted of water:acetonitrile (60:40, v/v), applied at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹, injection volume was 20 μ L and elution of peaks was monitored at 244 nm. (E) UV spectrum no irradiated and irradiated samples of DFZ.

It is known that the main photodegradation process of corticoids involves loss of the side-chain at position 17 (ALBINI; FASANI, 1998) or rearrangements of steroidal cross-conjugated dienones localized in the Ring A (OGATA et al., 1998; SHIRASAKI et al., 2004). The loss of the DFZ side-chain at C (17) was studied under basic conditions and degradation product was isolated and identified as 21-hydroxy deflazacort (21-OH-DFZ), with a retention time of 4.7 min, using the same HPLC conditions applied in this photostability study (PAULINO et

al., 2012). DFZ irradiated samples did not presented peaks around this retention time, suggesting no loss of the side chain.

3.3. SOLID STATE CHARACTERIZATION

Characterization of RM1, RM2 and R4 was performed by the following techniques: DSC, DRIFT and XRPD before and after UV irradiation and temperature/humidity conditions. The DSC curves of DFZ reference standard (Figure 6A) showed one thermal event at 253.7 °C, which refers to the melting point. DSC curves of RM1I*, RM2I* and R4I* (Figure 6B), the main finding is the disappearance of the characteristic DFZ fusion peak and the occurrence of other events around 241.0, 242.87 and 248.0 °C, respectively. The melting event of DFZ after 6 months under temperature and humidity (40 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ RH) conditions remain practically unchanged, similarly to DFZ reference standard (Figure 6C), and can be considered as a superposition of both curves.

DRIFT Spectra of DFZ reference standard, irradiated samples (RM1I*, RM2I* and R4I*) and spectra of the samples subject to temperature and humidity are shown in figure 7A, B, C respectively. The four main regions for identifying DFZ are at 1749, 1730 and 1652 cm^{-1} , referring to carbonyl groups and the characteristic band corresponding to the stretch vibration of the OH which appeared as a broad band centered at 3460 cm^{-1} (CUFFINI et al., 2007). RM1 and RM2 samples showed similar spectra to DFZ reference standard. However the band referring to hydroxyl group (about 3460 cm^{-1}) seems to have disappeared in R4.

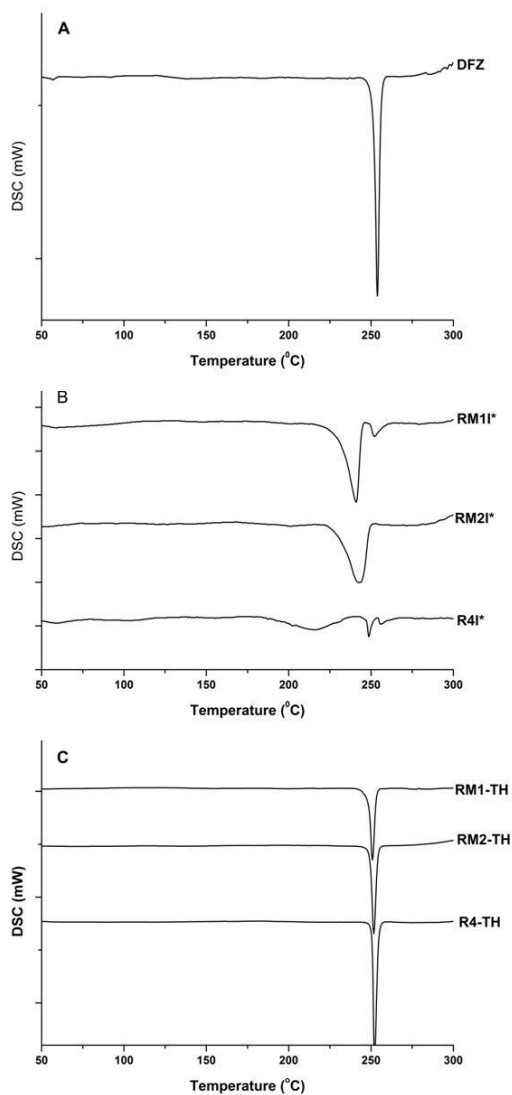


Figure 6: Differential scanning calorimetry (DSC) (A) DFZ reference standard; (B) samples submitted to UV irradiated (1.2 million lux/hour); (C) samples submitted to temperature and humidity (40 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ RH)/6 months. Dynamic nitrogen atmosphere (50 mL min^{-1}) and heating rate of 10 °C min^{-1} .

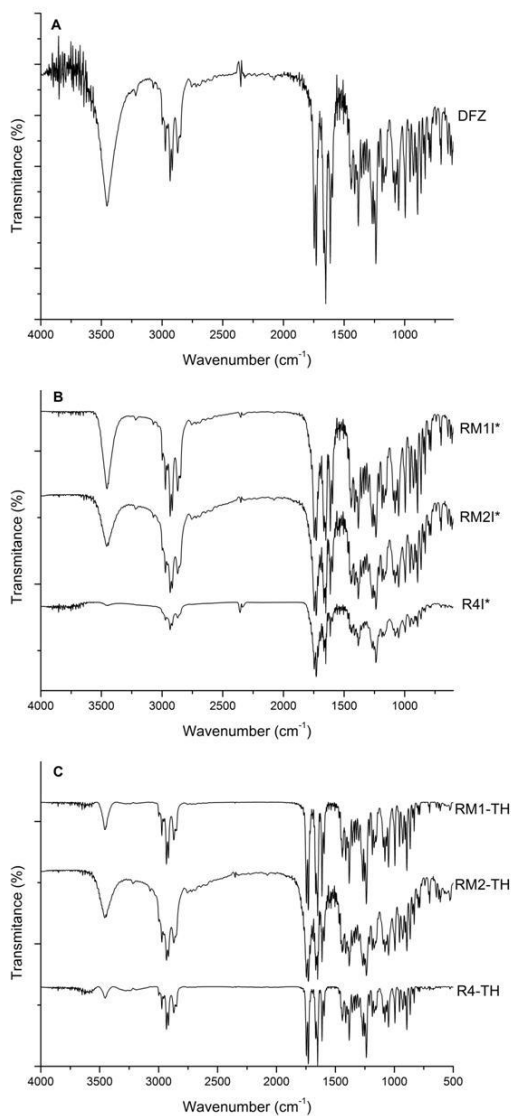


Figure 7: Diffuse reflectance infrared Fourier transformed spectroscopy of: (A) DFZ reference standard, (B) UV irradiated (1.2 million lux/hour) samples; (C) samples submitted to temperature and humidity (40 ± 2 °C/ 75 ± 5 % RH)/6 months.

The X-ray diffraction patterns of samples are shown in figure 8. All samples were identified with the same crystalline structure.

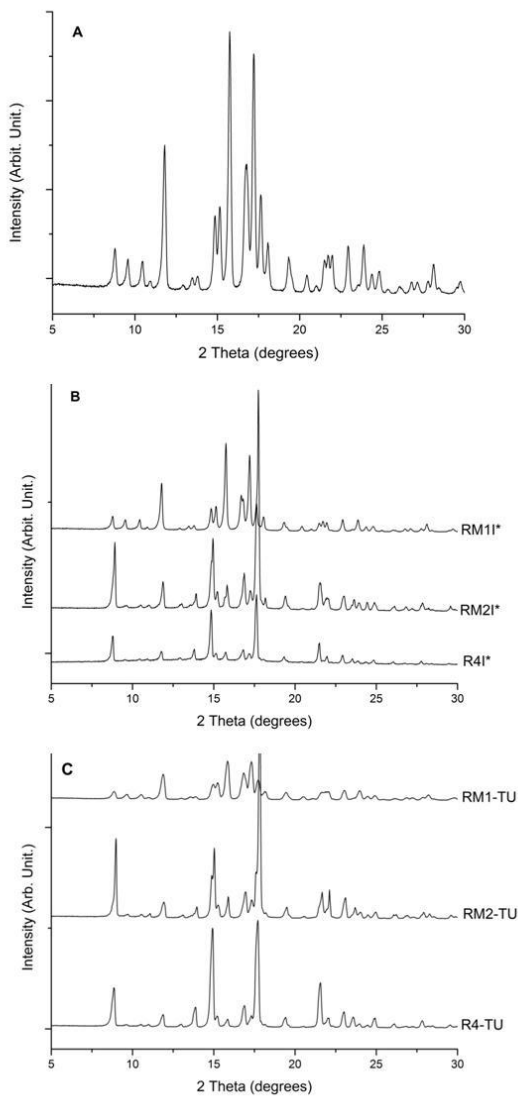


Figure 8: X-Ray Diffraction of: (A) DFZ reference standard, (B) UV irradiated (1.2 million lux/hour) samples; (C) samples submitted to temperature and humidity (40 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ RH)/6 months.

Molecular packing has an important role in determining the photostability in the solid state and this fact has been correlated with the possibility of oxygen to penetrate in the crystal in such structures (ALBINI; FASANI, 1998). DFZ crystalline structure are the same in all samples studied, demonstrating that stability conditions evaluated not lead to the formation of polymorphs. DFZ presented a rigid molecular packing (CUFFINI et al., 2007), however this is not sufficient to protect it from light action. In spite of RM1, RM2 and R4 to be the same polymorphic form, showed different percentages of degradation during the photostability study, as show in table 1. This difference appears to be related to other factors such morphology, particle size and surface area. Paulino et al (2013) demonstrated that RM2 had a smaller surface area while R4 showed a surface area around half that observed for RM1. Small amount of aggregated RM1 material is present, in spite to have a smaller particle size than R4 and RM2 (PAULINO, A S et al., 2013). RM1 aggregated particle could explain the greater photostability, however crystal habit and crystallinity also interfere directly in this degradation process, since the largest particle size and smaller surface area of RM2 and R4 was not sufficient to maintain the stability of these raw materials, when compared with RM1.

3.4. Characterization of the photoproduct of hollow crystal

The hollow crystal was the sample with the highest influence of the UV light (about 73% of degradation). Photolysis mechanisms of 11- β -hydroxy steroidal drugs has been studied and have demonstrated the formation of 1,11-epoxy steroid (WILLIAMS et al., 1980) and others intermediates ("lumiketone" 2 a-c) products as showed in Figure 9 (3a-c).

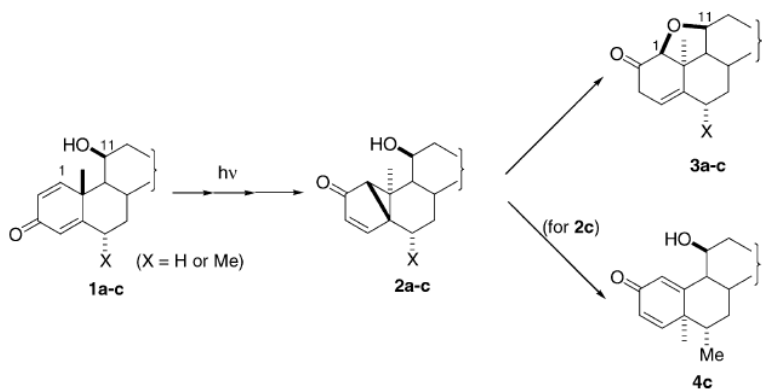


Figure 9: Photoisomerization pathway of 11β-hydroxy steroid (SHIRASAKI et al., 2004).

The absence of the band at 3460 cm^{-1} (DRIFT) for R4, referring to the hydroxyl group, the disappearance of UV absorption band and absence of peak of degradation products in chromatograms may suggest that the photodegradation of DFZ solid could be occurring in the A ring. In order to check the formation of the lumiketone intermediate or epoxy product, R4 was characterized on the base of mass and ^1H -NMR spectroscopy. From the total ion chromatograms (TIC) monitoring by HPLC/MS, DFZ eluted at about 14 minutes with absorption at 244 nm and measured m/z of 442.3 as shown in Figure 10E. One other peak was observed, with retention time of 21 minutes (Figure 10J) which showed the same mass and showed no UV absorption in 244 nm (Figure 10 F). This suggests that not occurred DFZ molecule breaking or loss of atoms during photostability study. The ^1H NMR spectrum of DFZ reference standard and irradiated R4 are presented in Figure 11. ^1H NMR spectra of R4 is superimposable to that of DFZ reference standard. This indicated that the steroidal skeleton was unaffected. As DFZ has 8 chiral centers located at C8, C9, C10, C11, C13, C14, C16 and C17. We can suggest that isomerization or epimerization is taking place in one of these chiral centers. However, further studies are needed to confirm this.

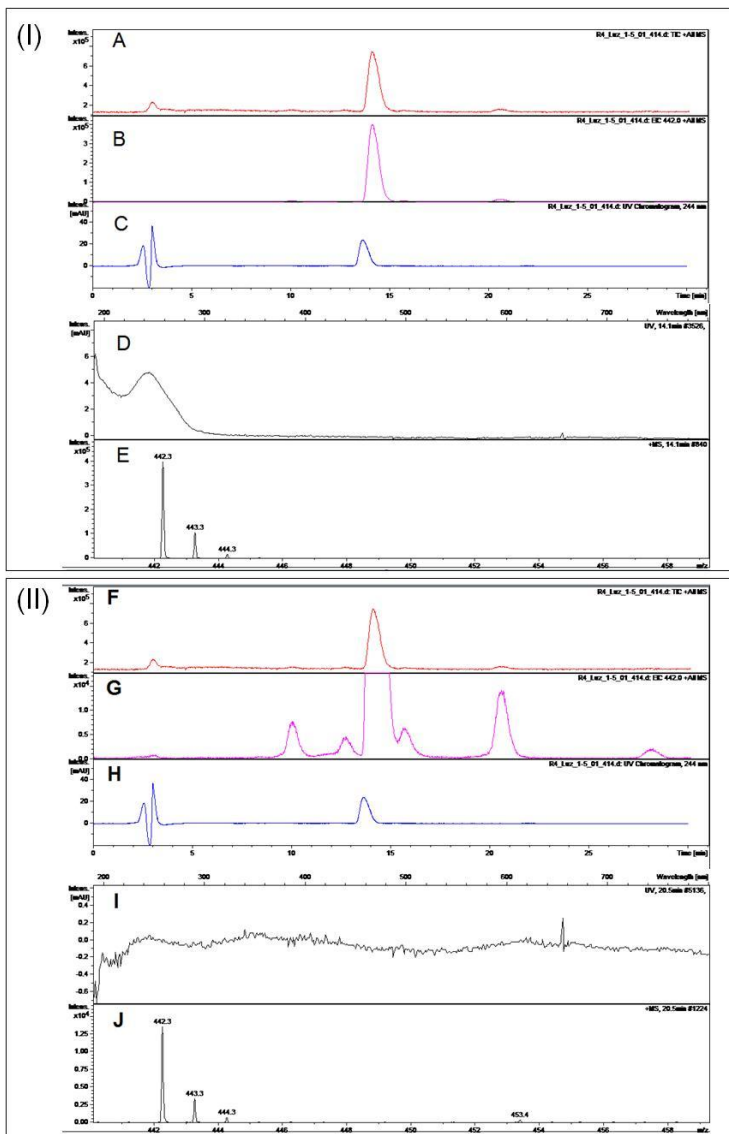


Figure 10: (I) (A) Total ion chromatograms (TIC) and all mass; (B) total ion chromatograms (TIC) and mass 442; (C) UV chromatogram 244 nm; (D) UV pick 14.1 min; (E) mass of pick 14.1 min. (II) Magnification of (I). (F) Total ion chromatograms (TIC) and all mass; (G) total ion chromatograms (TIC) and mass 442; (H) UV chromatogram 244 nm; (I) UV pick 14.1 min; (J) mass of pick 14.1 min.

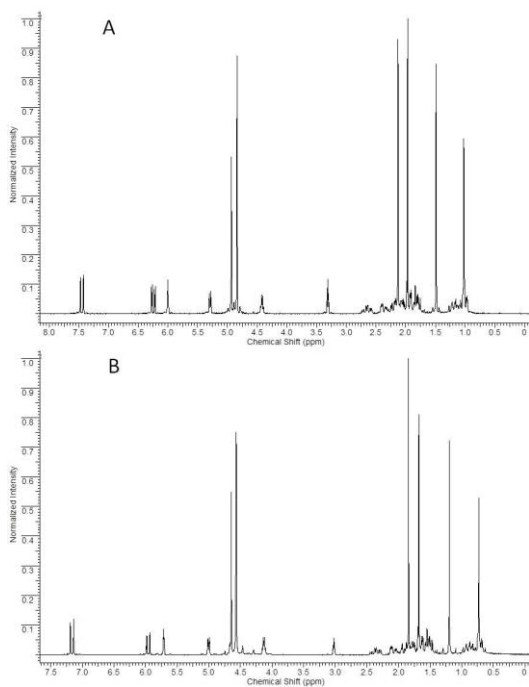


Figure 11: ^1H NMR spectra of DFZ: (a) DFZ reference standard; (b) R* UV irradiated.

3.5. *IN VITRO* ASSAY.

According to ICH Q3B (R2) (2006) degradation product can be classified as impurities, and must be qualified when present at levels above the qualification threshold. Qualification is the process of acquiring and evaluating data that establishes the biological safety of an individual impurity or a given impurity profile at the level(s) specified (ICH, 2006). The *in vitro* studies were performed with non-irradiated DFZ (R4) and with R4I* UV-irradiated sample that containing approximately 73% of degradation. Modulation of iNOS and COX-2 transcripts were quantified on RAW 264.7 Macrophage in absence or in presence of DFZ before (R4) and after (R4 I*) irradiation. R4 sample was evaluated without purification method. As shown in Figure 12, R4 or R4 I* did not change the cell viability in all concentration used in the experiments, except R4 I* at $300\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ that reduced significantly the cell viability in RAW 264.7. These results suggest that the irradiation

change the molecular structure of R4 and increasing the cytotoxicity of this compound.

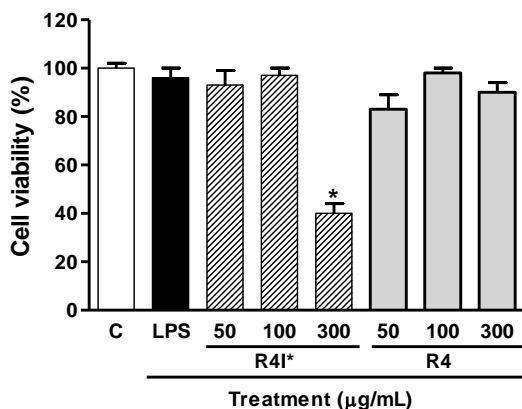


Figure 12: RAW 264.7 cell viability in 24 hours after incubation with LPS (control group), or R4 UV-irradiated (R4 I*) or non-irradiated DFZ (R4) reference standard at concentrations 50, 100 or 300 µg/mL in the medium. Bars represents the mean of cell viability (%) evaluated in triplicate and * $P < 0.05$, statistical difference between treatment and the control group.

3.5.1. INOS AND COX-2 GENE EXPRESSION.

To evaluate the impact of deflazacort (R4 or R4 I*)-treatment in the gene expression of LPS-induced RAW 264.7 cells, iNOS and COX-2 transcripts were quantified by Real Time PCR. The results showed that LPS induced an increase (delta-delta CT values below one) in

iNOS- and COX-2-gene expression (Figures 13 and 14, respectively).

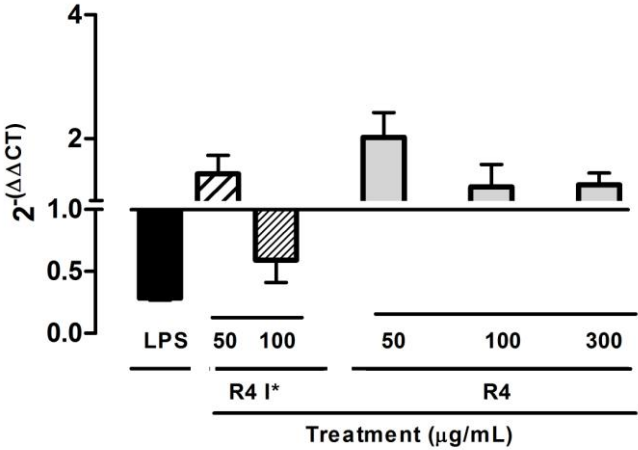


Figure 13: Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression levels modulated by LPS. R4 UV irradiated (R4 I*) and non-irradiated DFZ reference standard in RAW 264.7 cells. Results were expressed as $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ and means that values below one show an increase in gene expression while values above one demonstrate gene expression inhibition.

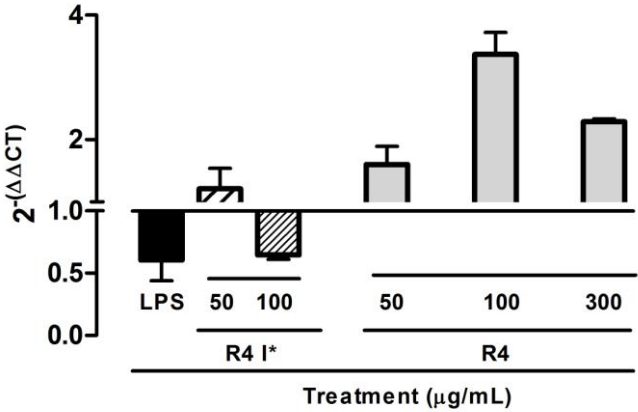


Figure 14: Inducible cyclooxygenase-2 (COX-2) gene expression levels modulated by LPS. Irradiated R4I* and DFZ non-irradiated compounds in RAW 264.7 cells. Results were expressed as $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ and means that values below one show an increase in gene expression while values above one demonstrate gene expression inhibition.

In addition, we have shown that R4 inhibits significantly the COX-2 and iNOS-gene expression (delta-delta CT values above one) in LPS-induced macrophage cell line, respectively. We have demonstrated, also that, in contrast, R4 I* did not produced these inhibitory effects. These results suggest that the irradiation change the molecular structure of R4 and reduce the pharmacological activity, in special the COX-2 and iNOS-gene expression modulation.

Inflammatory mediators such as NO and pro-inflammatory cytokines are involved in host defense mechanisms: their overproduction contributes to the pathogenesis of several inflammatory diseases including bacterial sepsis, rheumatoid arthritis, chronic inflammation, and hepatitis (LASKIN; PENDINO, 1995; SHAPIRA et al., 1996; TILG et al., 1992). During infection and inflammation, high production of NO has shown several modulations of gene expression and in some cases to cause DNA damage (NGUYEN et al., 1992). There are strong evidences that prostaglandins also play an important role as mediators of the inflammatory response. These mediators are constitutively produced by means of cyclooxygenase 1 (COX) (SMITH et al., 1991), but COX has been found in at least two isoforms: COX-1 and COX-2. COX-1 is expressed constitutively in most tissues and is responsible for the homeostatic production of prostaglandins. COX-2 is induced by several stimuli, including inflammatory stimulus, cytokines and growth factors. After expression COX-2 produces large amounts of pro-inflammatory prostaglandins at the inflammation site, and its uncontrolled activity is thought to play an important role in the pathogenesis of many chronic inflammatory diseases(LEE et al., 1992).

In TNF- α or LPS-stimulated cells, such as RAW 264.7, this results in phosphorylation and degradation of the inhibitory protein I- κ B, leading to the release of NF- κ B from I- κ B and increasing its translocation into the nucleus (BARNES, 1998). This is the main mechanism involved in NO, PGE₂ production and iNOS, COX-2 expression in RAW 264.7 macrophage cell lines.

Glycocorticoids have the capacity to inhibit PLA2, COX and iNOS enzymes, accounting for their anti-inflammatory mechanism. Therefore, the inhibition of iNOS activity or down-regulation of iNOS expression may be beneficial to reducing the inflammatory response (KIM et al., 2004). Our results show that R4 inhibits significantly the COX-2 and iNOS (delta-delta CT values above one) gene expression in LPS-induced cells, respectively. We have demonstrated, also that, in contrast, R4 I* did not produced this inhibitory effect. These results

suggest that the irradiation change the molecular structure of R4 and reduce the pharmacological activity, in special the COX-2 and iNOS gene expression modulation in concentrations used in the experiments.

Moreover, it can be corroborated that this inhibition is not due to cytotoxicity concentration, since cell viability to non-irradiated R4 was 90%. The results in RAW 264.7 cells indicate an inhibitory effect on activation by LPS accompanied by a decrease in the expression of iNOS and COX-2 protein in a concentration-dependent manner. These data demonstrated that iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages was suppressed by DFZ non-irradiated (R4) but not by DFZ irradiated (R4 I*).

This suppression can be associated with the decrease of p50NF- κ B nuclear translocation, as described by Lanza et al., 1999 with other related glucocorticoids (LANZA et al., 1999). Recently, Newton (2013) describe the mechanisms by which glucocorticoids effect repression of inflammatory gene expression and inflammatory transcription factors to repress transcriptional activity (transrepression) (NEWTON, 2013). For example: the dual specificity phosphatase, DUSP1, reduces activation of mitogen-activated protein kinases; glucocorticoid-induced leucine zipper (TSC22D3) represses nuclear factor- κ B (NF- κ B) and activator protein 1 (AP-1) transcriptional responses; inhibitor of κ B α (NFKBIA) inhibits NF- κ B; trisaprolin (ZFP36) destabilises and translationally represses inflammatory mRNAs; CDKN1C, a cell cycle regulator, may attenuate JUN N-terminal kinase signalling; and regulator of G-protein signalling 2 (RGS2), by reducing signalling from G α q-linked G protein-coupled receptors (GPCRs), is bronchoprotective (NEWTON, 2013).

In fact, the potency of glucocorticoids, dexamethasone, prednisolone and deflazacort has been described by Lanza (1999) (LANZA et al., 1999), showing a possible difference in the genomic effect of these different glucocorticoids. These data, coupled with the hypothesis of non-genomic receptor-mediated physicochemical actions of these compounds, can help us to explain the effect presented in this work.

All results taken together suggest that irradiation of DFZ can produce change in the molecular structure and reduce its pharmacological effect. We have showed that the steroidal skeleton was unaffected. However, DFZ has 8 chiral centers suggesting isomerization or epimerization, forming a new chemical characteristic to DFZ, probably in the C11, and changing the points to interact with glucocorticoids receptor (Figure 15).

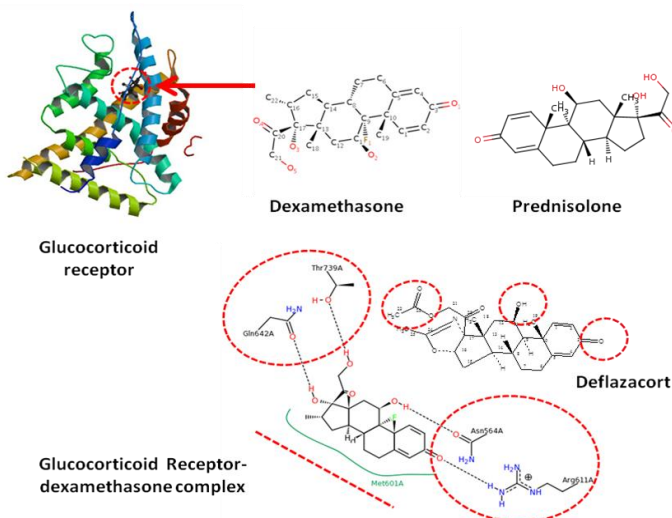


Figure 15: Schematic representation to explain the points to interaction between glucocorticoids and glucocorticoids-receptor. Legend: black dashed lines - hydrogen bonds, salt bridges, metal interactions; green solid lines - hydrophobic interactions; green dashed lines - Pi-Pi, Pi-cation interactions. Note: covalent bonds to proteins are not displayed (Interactions for instance 1P93:DEX:A:1999). (Adapted from <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1P93>).

New experiments are now in performing to investigate the points in deflazacort molecular structure to explain the effect of irradiation in glucocorticoid receptor interaction.

4. CONCLUSIONS

Hollow crystal is a crystalline habit important to improve the dissolution properties of DFZ. The effect of solid state property of hollow crystal, micronized and crystalline DFZ were evaluated using *in vivo* models. The results showed that hollow crystal led an increased of anti-inflammatory effect. Concerning to stability, the samples were stable when submitted to temperature and humidity ($40 \pm 2^\circ\text{C}/75 \pm 5\%$ RH) conditions. However, they were sensitive to UV light (1.2 million lux/hour), showing that stability depends on the crystal habit. Hollow crystal (R4) had the highest percentage of photodegradation (about

73%). The results show that non-irradiated DFZ was more efficient than UV irradiated sample (R4) in decreasing the inflammatory effects during the evaluation in RAW 264.7. Furthermore, R4 was not able to reduce the expression of these enzymes. Despite hollow crystal advantages on the dissolution rate (PAULINO et al., 2013) and better anti-inflammatory activity when compared to micronized and crystalline raw material, R4 showed lower stability when subjected to UV irradiation. For this reason DFZ must be protected from light during storage and use.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank CNPq and CAPES for financial support and student fellowships. Silvia L. Cuffini thanks CAPES for a Visiting Professor grant and CONICET Argentina for fellowships. The authors would also like to thank LDRX-UFSC for technical support during the X-ray diffraction analysis, CEBIME for mass spectrometry and Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC) for SEM measurements.

REFERENCES

- ALBINI, A.; FASANI, E. Photochemistry of Drugs : An Overview and Practical Problems. In: ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY (Ed.). **Drugs: Photochemistry and Photostability**. Italy: [s.n.], 1998. p. 1–73.
- BARNES, P. J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. **Clinical Science**, v. 94, n. 6, p. 557–72, jun 1998.
- CAFFIERI, S.; DALL'ACQUA, S.; CASTAGLIUOLO, I.; BRUN, P.; MIOLO, G. UVB photolysis of hydrocortisone 21-acetate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 4-5, p. 771–7, 5 ago 2008.
- CALIXTO, J. B.; ZANINI, J. C.; CRUZ, A. B.; YUNES, R. A.; MEDEIROS, Y. S. Extract and compounds obtained from mandevilla velutina inhibit arachidonic acid-induced ear oedema in mice, but not rat

stomach contraction. **Prostaglandins**, v. 41, n. 5, p. 515–526, maio 1991.

CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Médica**, v. 70, n. 2, p. 93–103, fev 2004.

CHEN, J.; SARMA, B.; EVANS, J. M. B.; MYERSON, A. S. Pharmaceutical Crystallization Published as part of the Crystal Growth & Design 10th Anniversary Perspective. **Crystal Growth & Design**, v. 11, p. 887–895, 2011.

CUFFINI, S.L.; ELLENA, J.F.; MASCARENHAS, Y.P.; AYALA, A.P.; SIELSER, H.W.; FILHO, J.M.; MONTI, G. A.; AIASSA, V.; SPERANDEO, N.R. Physicochemical characterization of deflazacort: thermal analysis, crystallographic and spectroscopic study. **Steroids**, v. 72, n. 3, p. 261–9, mar 2007.

GARCIA, E.; BOISTELLE, R.; HOFF, C. Crystallization and dissolution of pharmaceutical compounds An experimental approach. **Journal of Crystal Growth**, v. 199, p. 1360–1364, 1999.

ICH. **Impurities in New Drug Products Q3B(R2)**, [S.l: s.n.], 2006.
Disponível em:
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2_Guideline.pdf

JOSHI, N.; RAJESHWARI, K. Deflazacort. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 55, n. 4, p. 296–300, 2009.

KAWABATA, Y.; WADA, K.; NAKATANI, M.; YAMADA, S.; ONOUE, S. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 1–10, 25 nov 2011.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, n. 3, p. 229–45, nov 2004.

LANZA, L.; SCUDELETTI, M.; MONACO, E.; et al. Possible differences in the mechanism(s) of action of different glucocorticoid hormone compounds. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 876, p. 193–7, 22 jun 1999.

LASKIN, D. L.; PENDINO, K. J. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 35, p. 655–77, jan 1995.

LAX, E. R.; MILITZER, K.; TRAUSCHEL, A. A simple method for oral administration of drugs in solid form to fully conscious rats. **Laboratory Animals**, v. 17, n. 1, p. 50–4, jan 1983.

LEE, S.H.; SOYOOLA, E.; CHANMUGAM, P.; HART, S.; SUN, W.; ZHONG, H.; LIOU, S.; SIMMONS, D.; HWANG, D. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 36, p. 25934–8, 25 dez 1992.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez 2001.

MIOLO, G.; GALLOCCHIO, F.; LEVORATO, L.; DALZOPPO, D.; BEYERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, G.M.J.; CAFFIERI, S. UVB photolysis of betamethasone and its esters: characterization of photoproducts in solution, in pig skin and in drug formulations. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 96, n. 1, p. 75–81, 17 jul 2009.

MODI, S.R.; DANTULURI, A.K.R.; PURI, V.; PAWAR, Y.B.; NANDEKAR, P.; SANGAMWAR, A.T.; PERUMALLA, S.R.; SUN, C.C.; BANSAL, A.K. Impact of Crystal Habit on Biopharmaceutical

Performance of Celecoxib. **Crystal Growth & Design**, v. 13, n. 7, p. 2824–2832, 3 jul 2013.

NEWTON, R. Anti-inflammatory glucocorticoids: Changing concepts. **European Journal of Pharmacology**, p. 1–6, 6 jun 2013.

NGUYEN, T.; BRUNSON, D.; CRESPI, C.L.; PENMAN, B.W.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 7, p. 3030–4, 1 abr 1992.

OGATA, M.; NORO, Y.; YAMADA, M.; TAHARA, T.; NISHIMURA, T. Photodegradation Products of Methylprednisolone Suleptanate in Intermediate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 1, p. 91–95, 1998.

OPPONG, E.; FLINK, N.; CATO, A. C. B. Molecular mechanisms of glucocorticoid action in mast cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 22 maio 2013.

PATIL, S. K.; WAGH, K. S.; PARIK, V. B.; AKARTE, A. M.; BAVISKAR, D. T. Strategies for solubility enhancement of poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 8, n. 2, p. 74–80, 2011.

PAULINO, A.S.; RAUBER, G.; CAMPOS, C.E.M.; MAURÍCIO, M.H.P.; DE AVILLEZ, R.R.; CAPOBIANCO, G.; CARDOSO, S.G.; CUFFINI, S.L. Dissolution enhancement of Deflazacort using hollow crystals prepared by antisolvent crystallization process. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 2, p. 294–301, 13 maio 2013b.

PAULINO, A.S.; RAUBER, G.; DEOBALD, A.M.; PAULINO, N.; SAWAYA, A.C.H.F.; EBERLIN, M.N.; CARDOSO, S.G. Isolation and characterization of a degradation product of deflazacort. **Pharmazie**, v. 67, p. 495–499, 2012.

PAULINO, A.S.; RAUBER, G.S.; CAMPOS, C.E.M; MAURÍCIO, M.H.P.; DE AVILLEZ, R.R.; CUFFINI, S.L.; CARDOSO, S.G. Hollow crystal anti-solvent preparation process as a promising technique to improve dissolution of poorly soluble drugs. **Journal of Crystal Growth**, v. 366, p. 76–81, mar 2013a.

RASCHKE, W. C.; BAIRD, S.; RALPH, P.; NAKOINZ, I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. **Cell**, v. 15, n. 1, p. 261–7, set 1978.

SCREMIN, A.; PIAZZON, M.; SILVA, M.A.S.; KUMINEK, G.; CORREA, G.M.; PAULINO, N.; CARDOSO, S.G. Spectrophotometric and HPLC determination of deflazacort in pharmaceutical dosage forms. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, p. 281–287, jun 2010.

SHAPIRA, L.; SOSKOLNE, W.A.; HOURI, Y.; BARAK, V.; HALABI, A.; STABHOLZ, A. Protection against endotoxic shock and lipopolysaccharide-induced local inflammation by tetracycline: correlation with inhibition of cytokine secretion. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 3, p. 825–8, mar 1996.

SHIRASAKI, Y.; INADA, K.; INOUE, J.; NAKAMURA, M. Isolation and structure elucidation of the major photodegradation products of loteprednol etabonate. **Steroids**, v. 69, n. 1, p. 23–34, jan 2004.

SMITH, W. L.; MARNETT, L. J.; DEWITT, D. L. Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 49, n. 3, p. 153–79, jan 1991.

TENG, X. W.; CUTLER, D. C.; DAVIES, N. M. Degradation kinetics of mometasone furoate in aqueous systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 259, n. 1-2, p. 129–41, 18 jun 2003.

TILG, H.; WILMER, A.; VOGEL, W.; HEROLD, M.; NÖLCHEN, B.; JUDMAIER, G.; HUBER, C. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. **Gastroenterology**, v. 103, n. 1, p. 264–74, jul 1992.

TØNNESEN, H. H. **Phostability of Drugs and Drug Formultions**. 2. ed. New York: [s.n.], 2004. p. 412

WILLIAMS, R.; MOORE, I. R. H.; LI, R.; WEEKSLC, C. M.
Photochemistry of 1 la- and 110-Hydroxy Steroidal 1,4-Dien-3-ones and
1 laand 1 lp-Hydroxy Steroidal Bicyclo[3.1.0]hex-3-en-2-onesi n
Neutral and Acidic Media. **American Chemical Society**, v. 45, n. 12, p.
2324–2331, 1980.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of
experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109–110,
jun 1983.

CAPÍTULO 6: DISCUSSÃO GERAL

DISCUSSÃO

As propriedades biofarmacêuticas dos APIs podem afetar a biodisponibilidade, segurança e eficácia (BLAGDEN et al., 2007). A forma sólida de um API é definida pela estrutura interna do cristal e pelo hábito cristalino e estes podem ter uma considerável influência sobre as propriedades físico-químicas e consequentemente na biodisponibilidade, segurança e eficácia (AGRAWAL et al., 2004; BLAGDEN et al., 2007; MODI et al., 2013).

Diversos métodos têm sido utilizados com o objetivo de aumentar a velocidade de dissolução de fármacos de baixa solubilidade e consequentemente o desempenho biofarmacêutico. Uma das técnicas mais utilizadas é a micronização, mas que pode levar a problemas de superfície da partícula, tais como carga estática e aglomeração das partículas (CHIKHALIA et al., 2006).

A cristalização é uma operação importante que controla as propriedades físicas do material, tais como o hábito cristalino, a distribuição do tamanho do cristal e o polimorfismo (GARCIA et al., 1999). Diversas técnicas de cristalização estão disponíveis e entre estas está a cristalização pelo método do antissolvente, que é utilizado para obtenção de partículas ultrafinas. No entanto, variações neste método, tais como solvente, grau de sobressaturação, temperatura, aditivos, agitação podem influenciar na estrutura cristalina e hábito cristalino (SUNAGAWA, 2005). Poucos estudos têm investigado o impacto da cristalização no hábito cristalino e deste nas propriedades biofarmacêuticas.

O método do antissolvente, por ser simples e rápido, foi o método utilizado para a cristalização do DFZ, fármaco anidro de classe II, com o objetivo de melhorar as características de dissolução do fármaco. Através desta técnica foram obtidos cristais ocos, os quais apresentaram bom desempenho de dissolução. Existem alguns relatos de cristais ocos para substâncias orgânicas (EDDLESTON; JONES, 2010; MALLET et al., 2004) mas, especialmente para fármacos, há uma lacuna na literatura. A carbamazepina, por apresentar problemas de solubilidade, tem sido bastante estudada e diferentes estratégias têm sido aplicadas a este fármaco com o objetivo de melhorar o seu perfil de dissolução. Como havia relatos de cristais ocos para o polimorfo II da CBZ através do método de evaporação usando solvente orgânico (EDDLESTON; JONES, 2010) e por ser um fármaco anidro investigou-se a possibilidade de formação destes através do método do antissolvente.

Os fármacos foram cristalizados através do método do antissolvente, utilizando diferentes proporções solvente-antissolvente (metanol:água), sendo que o antissolvente é utilizado com o objetivo de diminuir a solubilidade, aumentar a sobressaturação e a força impulsora para a cristalização (VICOSA et al., 2012). Os resultados mostraram que imediatamente após a adição do antissolvente houve a cristalização, podendo esta ser percebida visualmente. Através da microscopia eletrônica de varredura, os cristais ocos puderam ser visualizados em todas as condições testadas.

Os resultados encontrados para os cristais ocos de DFZ e de CBZ foram comparados com as matérias-primas disponíveis comercialmente (com outros hábitos cristalinos) através da eficiência de dissolução, que está relacionada à quantidade real de fármaco dissolvido no meio. A velocidade de dissolução dos cristais ocos foi superior para ambos os fármacos comprovando, assim que a este novo hábito contribui efetivamente no desempenho da dissolução. Para avaliar mudanças na estrutura cristalina foi utilizada a caracterização por XRPD e demonstrou que o cristal oco de DFZ apresentou a mesma estrutura cristalina que a matéria-prima. No entanto, para a CBZ houve alteração polimórfica. A CBZ apresenta polimorfismo e cristaliza em 4 polimorfos anidros diferentes (GRZESIAK et al., 2003). No difratograma da CBZ matérias-primas foram encontradas reflexões características do polimorfo III do fármaco, enquanto que para os cristais ocos as reflexões correspondem ao polimorfo I. Estudos termoanalíticos e de infravermelho também permitiram diferenciar estes polimorfos. O processo de cristalização da CBZ através do método do antissolvente possibilitou a obtenção de cristais ocos, com estrutura cristalina diferente da matéria-prima usada inicialmente, enquanto que para o DFZ foi mantida a mesma estrutura cristalina.

O polimorfismo é um fator importante na velocidade de dissolução dos fármacos, e estudos realizados por Kobayashi e colaboradores (2000) demonstraram que a velocidade de dissolução intrínseca do polimorfo III da CBZ é maior que a do polimorfo I. Levando isto em consideração, a CBZ-RM (polimorfo III) deveria ter um perfil de dissolução maior que os cristais ocos, que correspondem ao polimorfo I. No entanto isto não ocorreu, demonstrando que os cristais ocos contribuíram significativamente para um aumento na taxa de dissolução da forma polimórfica menos solúvel do fármaco (forma I). Os resultados demonstraram que 75% da CBZ-C foi dissolvida após 20 minutos, enquanto somente 27% da matéria-prima dissolveram nestas mesmas condições. Isto mostra que a obtenção de cristais ocos é um

método importante na melhoria do perfil de dissolução de fármacos poucos solúveis em água, como a CBZ.

Estudos demonstrando o aumento da velocidade de dissolução com cristais ocós são praticamente inexistentes na literatura. Foram encontrados apenas dois estudos mostrando o impacto do hábito cristalino nas propriedades biofarmacêuticas (MANISH et al., 2005; MODI et al., 2013).

Os resultados obtidos demonstraram que o método de antissolvente pode ser uma estratégia interessante para obtenção de cristais com hábitos modificados de fármacos poucos solúveis, levando a um aumento significativo do perfil de dissolução, podendo contribuir para uma melhor biodisponibilidade destes fármacos.

Para um melhor entendimento do processo de dissolução foram realizados estudos comparativos entre os cristais ocós de DFZ, hábito cristalino colunar e matéria-prima micronizada. A caracterização do estado sólido de matérias-primas de DFZ nas formas micronizada (RM1), cristalina (RM2) e os cristais ocós (R4) obtidos pelo método de antissolvente foi realizada através das seguintes técnicas: SEM, XRPD, TG/DTG, DSC e DRIFT.

A microscopia eletrônica de varredura das matérias-primas revelou partículas que apresentam distintos hábitos cristalinos e formato irregular. A matéria-prima RM1 apareceu como cristais pequenos, agregados, com superfície lisa e morfologia homogênea, apresentando características que estão de acordo com matéria-prima micronizada. A matéria-prima cristalina (RM2) apresentou-se com partículas grandes, com formato colunar e retangular, demonstrando que não foi submetida ao processo de micronização. O cristal oco (R4) apresentou o hábito cristalino de maior tamanho. Estas diferenças no hábito cristalino podem modificar as propriedades físicas e químicas dos fármacos (SHEKUNOV; YORK, 2000), assim como a velocidade de dissolução e a biodisponibilidade (MODI et al., 2013; WANG et al., 2013).

Estudos por difração de raios X foram realizados com o objetivo de obter mais informações sobre as características cristalinas e polimorfismo. Os dados encontrados demonstraram que tanto as matérias-primas (RM1 e RM2) quanto o R4 apresentaram a mesma estrutura cristalina.

RM1, RM2 e R4, quando analisados por DSC, apresentaram um evento endotérmico próximo a 253 °C, referente ao ponto de fusão, e outro exotérmico, devido ao processo de degradação. Estes dados foram confirmados por TG, que demonstrou estabilidade térmica até 270 °C

($\Delta m = 0,984\%$) e um processo de decomposição entre 272–390 °C (Dados não mostrados).

Os espectros de DRIFT não mostraram diferenças para as matérias-primas e cristalizado analisados, apresentando as bandas características centradas em 3460 cm^{-1} , que correspondem ao estiramento do 11-OH, e três bandas centradas em 1749 cm^{-1} , 1730 cm^{-1} e 1652 cm^{-1} , que correspondem aos grupamentos carbonila presentes na molécula. Os dados encontrados estão de acordo com os dados reportados na literatura por Cuffini e colaboradores (CUFFINI et al., 2007).

Em relação à distribuição de tamanho de partículas, RM1, RM2 e R4 apresentaram valores de 3,3; 63,6 e 30,1 μm , respectivamente. Apesar dos resultados estarem coerentes com o tamanho de partícula para material micronizado e cristalino, observou-se, tanto no MEV quanto no ensaio de distribuição de tamanho de partícula, que RM1, apesar de ter o menor tamanho de partícula, apresentava aglomerados com tamanho em torno de 100 μm . Estas diferenças no tamanho de partícula e no hábito cristalino podem interferir diretamente nas propriedades biofarmacêuticas (ATTWOOD et al., 2003).

A velocidade de dissolução intrínseca é um ensaio que foi idealizado para evitar o efeito do hábito e do tamanho do cristal a fim de avaliar as propriedades físicas, tais como polimorfismo e/ou seu efeito na velocidade de dissolução (BRITTAİN, 2009), podendo ser avaliado desta forma as características intrínsecas do fármaco. Neste estudo verificou-se que RM1 apresentou uma velocidade de dissolução intrínseca menor que RM2 e R4. O esperado seria que os três apresentassem a mesma velocidade de dissolução, uma vez que influências do tamanho de partícula e hábito cristalino, que são fatores importantes na dissolução, são eliminadas na VDI. Desta forma, pode-se deduzir que outros fatores estão interferindo na solubilidade do DFZ. Como todas as amostras avaliadas apresentaram a mesma estrutura cristalina, foi excluída a possibilidade da influência de polimorfismo. A adesão (KENDALL; STAINTON, 2001) e a baixa molhabilidade das partículas é um fator importante na dissolução, principalmente para fármacos de baixa solubilidade (ATTWOOD et al., 2003; HAN et al., 2011). Para verificar o efeito de molhabilidade, adicionou-se 0,05% do agente tensoativo lauril sulfato de sódio (LSS) no meio de dissolução. O LSS tem como função diminuir a tensão superficial e aumentar a molhabilidade. Verificou-se que houve um aumento na velocidade de dissolução de RM1, não havendo diferenças significativas entre RM1, RM2 e R4. Este resultado sugere que a amostra micronizada possui

problema de molhabilidade, uma vez que a adição do surfactante conduziu a um aumento na taxa de dissolução, devido à melhora da molhabilidade.

O perfil de dissolução de RM1, RM2 e R4 foi realizado devido às diferenças entre tamanho de partícula, hábito cristalino e diferenças encontradas na VDI. O processo de micronização tem como objetivo diminuir o tamanho de partícula e, conseqüentemente, aumentar a velocidade de dissolução. RM1 apresentou um perfil e uma eficiência de dissolução significativamente maior que RM2, mas menor que R4. As diferenças encontradas para RM1 e RM2 podem ser explicadas através do tamanho de partícula e molhabilidade. No entanto, a diferença para R4 não pode ser explicada através do tamanho de partícula, visto que este tem um tamanho maior que RM1. O efeito do LSS foi também avaliado no perfil de dissolução. Este foi utilizado em concentrações abaixo da concentração micelar crítica (CMC) (0,05%) e demonstrou um aumento do perfil de dissolução para RM1 e R4, com um aumento significativo da eficiência de dissolução. Para RM2 este aumento não foi significativo, provavelmente devido ao grande tamanho de partícula e à alta cristalinidade. A adição de LSS em concentrações acima da CMC (0,5 e 1%) promoveu um aumento do perfil de dissolução logo nos primeiros minutos para R4, enquanto que para RM1 levou um tempo maior. Esta diferença no tempo de dissolução de RM1 ocorreu devido à aglomeração das partículas, que puderam ser visualizadas no MEV e na determinação do tamanho de partícula.

O processo de micronização altera as propriedades superficiais, conforme dados relatados na literatura para alguns fármacos, tais como carbamazepina (PERKINS et al., 2009), paracetamol (HENG; WILLIAMS, 2006; HENG et al., 2006), salbutamol (GAISFORD et al., 2010), revatropato (TICEHURST et al., 2000) e aspirina (TORRADO, 1998). As propriedades mecânicas e o aumento da energia superficial podem levar a aglomeração das partículas, o que provavelmente estaria levando a menor taxa de dissolução de RM1.

R4 apresentou o melhor perfil de dissolução em todas as condições estudadas, apesar de ter um tamanho de partícula maior que a matéria-prima micronizada. Isto pode ser explicado através da baixa aglomeração das partículas e do hábito cristalino oco, que leva a um aumento da área superficial melhorando, assim, o perfil de dissolução. RM2 apresentou o menor perfil de dissolução, mesmo em concentrações de LSS acima da CMC, devido à alta cristalinidade e maior tamanho de partícula.

Os resultados indicaram que os cristais ocos de DFZ levaram a um aumento significativo do perfil de dissolução do fármaco, quando comparado à matéria prima micronizada. As cápsulas contendo R4 apresentaram um efeito anti-inflamatório significativamente superior no tempo de 60 minutos quando comparados a capsulas contendo RM1 ou RM2 no estudo *in vivo*.

O estudo *in vivo* contribuiu para mostrar que este aumento na velocidade de dissolução pode levar a uma mais rápida e extensa absorção e efeito farmacológico.

Devido às vantagens dos cristais ocos de DFZ tornou-se necessário entender o mecanismo de formação destes, visto que a morfologia do cristal está diretamente relacionada ao mecanismo de crescimento e velocidade de crescimento *versus* a força impulsora ($\Delta\mu/(kBT)$) (SUNAGAWA, 2010).

O mecanismo de difusão de DFZ em solução foi avaliado através da cristalização utilizando o método de antissolvente e evaporação. Cristais ocos foram obtidos usando diferentes concentrações de DFZ, demonstrando que a concentração não interfere na morfologia do cristal, no entanto, a adição de antissolvente parece ser um fator importante. O uso do método com agitação mecânica ou sonicação levou à formação de cristais maciços, com superfície bem definida, sem a presença de cristais ocos na condição 1:1; no entanto, uma mistura de cristais ocos e maciços foi observada nas proporções 1:3 e 1:6, demonstrando que o processo de agitação interfere diretamente na formação dos cristais ocos.

Uma diminuição de solubilidade ocorreu rapidamente durante a adição de antissolvente (água) levando, consequentemente, a um aumento da supersaturação e da força impulsora. Isto explica a intensa e rápida cristalização em proporções de antissolvente maiores que 1:1 (DFZ-MeOH:água). Na condição 1:½ (DFZ-MeOH:água), devido à pequena quantidade de antissolvente, a supersaturação também depende da velocidade de evaporação do metanol, levando mais tempo para atingir a supersaturação necessária e iniciar o processo de nucleação.

Para confirmar a influência da evaporação do solvente, o processo de cristalização pelo método antissolvente foi realizado com cristalizador fechado, com o objetivo de reduzir a evaporação do metanol. Nestas condições foram obtidos cristais sólidos com uma menor velocidade de crescimento quando comparados aos ocos. Este resultado confirma que a evaporação é necessária para que o sistema atinja o ponto ideal de supersaturação para a formação do cristal oco.

Os cristais inicialmente nuclearam como um bloco sólido, que foi gradualmente convertido em oco. A velocidade de crescimento da

porção sólida foi lenta e quando iniciou o crescimento do oco esta se tornou mais rápida. Isto indica uma alta anisotropia de uma das faces. O aumento do raio de crescimento a/b dos cristais ocos também demonstra a alta anisotropia. Esta não ocorre nos cristais sólidos, visto que houve uma diminuição deste raio a/b.

A nucleação sólida pode ser explicada através da baixa saturação inicial. Isto mantém uma velocidade de crescimento uniforme na superfície do cristal. Consequentemente, quando ocorre o aumento da supersaturação inicia o crescimento da porção oca. Neste estágio, as bordas da face (100) crescem preferencialmente, enquanto o centro cresce lentamente. Esta face cresce mais rapidamente devido ao empacotamento cristalino, onde as três ligações C-H · · · N alinham o anel E quase perpendicularmente ao esqueleto esteroidal. Isto ocorre na face (100), formando um suporte que serve de encaixe para outras moléculas. A região do anel A cabe perfeitamente neste suporte, formando então o empacotamento do cristal com uma estrutura molecular estabilizada por contatos intermoleculares (CUFFINI et al., 2007). O empacotamento desta face contribui para a maior velocidade de crescimento na direção da face (100), formando o cristal oco.

Os resultados encontrados para a velocidade de crescimento dos cristais ocos de DFZ demonstraram que este cresce anisotropicamente, com um crescimento da face (100) diversas vezes maior que as outras faces.

A morfologia do cristal é dependente da correlação entre a força impulsora e a difusão de átomos íons, moléculas ou calor (OAKI; IMAI, 2003). Variações nestes parâmetros experimentais mudam a forma do cristal de poliedro em várias morfologias dendríticas (SAITO; UETA, 1989). Estudos mostraram que um aumento na diferença de concentração na superfície do cristal, anisotropia e velocidade de crescimento tem um significativo efeito na forma da interface e na morfologia da superfície (PAN et al., 2007). O cristal cresce sob condições constantes de supersaturação até alcançar certo tamanho, quando o crescimento poliédrico é perdido (CHERNOV, 1974; NANEV, 2000). A transformação da forma poliédrica em formato de funil (Hopper) é devido ao Efeito Berg, ocorrendo um aumento do efeito de difusão no processo de crescimento (OAKI; IMAI, 2003). Berg demonstrou que a concentração não é constante ao longo da superfície do cristal, mas é maior nos cantos e menor no centro da face (BERG, 1938). O Efeito Berg leva a uma maior concentração nos ápices e nas bordas do cristal e a concentração no meio da face do cristal é reduzida. O crescimento anisotrópico que ocorre, devido a não homogeneidade na

concentração leva ao aparecimento de uma curvatura definida no meio do cristal (CHERNOV, 1974). Nos resultados encontrados para o DFZ pode-se verificar a formação desta curvatura, que levam à formação do cristal oco.

As formas dendríticas aparecem após este estágio e indicam que o processo de crescimento ocorre por difusão limitada (OAKI; IMAI, 2003). O início do crescimento dendrítico é devido à competição entre o crescimento das faces de formação do oco e o supercrescimento dos dendritos (FAURE et al., 2003). Quando o processo de cristalização ocorre sem limitação no processo de difusão, a supersaturação é constante ao longo de toda a face de crescimento e estas crescem sob condições cinéticas controladas (NANEV, 2000).

Os resultados encontrados para o cristal oco de DFZ sugerem que este inicia devido ao efeito Berg e que a formação do cristal oco se encontra entre este efeito e o mecanismo de difusão limitada.

Os mecanismos de crescimento na superfície dos cristais apresentam três tipos principais de difusão, que são crescimento em espiral, nucleações bidimensionais e o tipo adesiva (CUBILLAS; ANDERSON, 2010; SUNAGAWA, 1999) e apresentam diferentes curvas de velocidade de crescimento versus força impulsora. Todas formam um cristal poliédrico, que de acordo com o tipo de difusão poderá evoluir a dendrítico. Imagens e vídeos do DFZ obtidos *in situ* através de microscopia óptica sugerem que a difusão na superfície do cristal oco de DFZ apresenta um crescimento em espiral. As análises por SEM revelaram crescimento espaçado regular em espiral e estes foram confirmados através da microscopia confocal. Na evolução de crescimento morfológico dos cristais, o crescimento em espiral localiza-se na região de crescimento liso e evolui para o efeito Berg, com formação de uma cavidade na superfície do cristal (SUNAGAWA, 2010). O crescimento em espiral para o DFZ confirma que este inicia pelo efeito Berg evoluindo para o crescimento oco, sem atingir a região dendrítica.

Com o objetivo de confirmar o efeito da água como força impulsora foi realizada a cristalização do DFZ somente em metanol. Em condições ambiente, idênticas a do método antissolvente, foram obtidos somente cristais sólidos, no entanto quando foram submetidos ao processo de cristalização em cristalizador aberto e com uma evaporação rápida (temperatura 40 °C), houve a formação de cristais ocos. O aumento da temperatura levou a uma alta evaporação do solvente, formando um gradiente de concentração na face do cristal, favorecendo o crescimento do cristal oco.

Estas características são uma consequência direta do fluxo diferencial em toda a face com as bordas sendo alimentada por um fluxo de difusão muito maior do que a posição central. Finalmente, isto conduz ao crescimento preferido nas bordas em relação ao centro, causando a formação de uma característica oca nesta face (PERRY et al., 2013). A agitação é responsável pela redução ou eliminação dos gradientes de concentração nas faces de crescimento dos cristais, sendo estes gradientes necessários para o crescimento dos cristais ocos (EDDLESTON; JONES, 2010). A mistura de cristais ocos e sólidos de DFZ obtidas com agitação ou ultrassom durante o processo de cristalização por antissolvente demonstra que houve uma redução destes gradientes de concentração e consequente formação de sólido.

Os resultados encontrados para o processo de cristalização do DFZ mostram que o mecanismo de cristalização dos cristais ocos ocorre por efeito Berg e a água não é um fator determinante na formação dos cristais ocos, tendo como função a diminuição da solubilidade e aumento da força impulsora. Foi possível obter cristais ocos em metanol puro através de um aumento da velocidade de evaporação do solvente com o objetivo de aumentar a força impulsora e a velocidade de cristalização necessária para a formação do oco. O nível de supersaturação e a velocidade de crescimento associado a um determinado gradiente de concentração permitem a formação do cristal oco.

O processo de cristalização e as características do estado sólido têm um importante papel nas propriedades físicas, químicas e biofarmacêuticas (AALTONEN et al., 2009), podendo interferir na estabilidade de acordo com o hábito cristalino formado. O estudo de estabilidade acelerado foi projetado para acelerar a possível degradação química e/ou mudanças físicas de insumos farmacêuticos ativos em condições forçadas de armazenamento. RM1, RM2 e R4 no estado sólido foram submetidas ao estudo de estabilidade em temperatura e umidade (40 ± 2 °C/ 75 ± 5 % UR) por um período de 6 meses e não apresentaram alterações, mantendo todas as suas propriedades químicas e físicas. No entanto, quando estas amostras foram submetidas ao estudo de fotoestabilidade (radiação UV 254 nm) apresentaram alteração de cor, tornando-se amarela, sendo que a cor foi mais intensa em R4, que nas outras amostras. Estes resultados sugerem mudanças físicas ou químicas nas amostras. Nos ensaios de análise térmica houve o deslocamento ou desaparecimento do ponto de fusão do DFZ, o que pode estar relacionados ao processo de degradação. Cuffini et al estudou a fotoestabilidade do DFZ e encontrou um deslocamento do ponto de

fusão para temperaturas menores nos ensaios por DSC. Este resultado foi atribuído ao processo de degradação visto que a cromatografia em camada delgada revelou produtos de degradação (CUFFINI et al., 2007).

A avaliação química por HPLC confirmou a degradação química do DFZ, mostrando uma redução na concentração do fármaco após a submissão deste a 1,2 milhões de lux/hora. R4 apresentou o maior percentual de degradação (em torno de 73%), seguido de RM1 e RM2. Nos cromatogramas não foram observados picos adicionais, apesar da redução no percentual de doseamento. O espectro de UV apresentou uma diminuição na absorção em 244 nm para RM1 e RM2, enquanto que para R4 houve uma diminuição quase que total desta banda. A ausência da banda em 3460 cm^{-1} no espectro de infravermelho para R4, a diminuição da banda de absorção no UV e a ausência de picos adicionais nos cromatogramas sugerem o desaparecimento dos grupos cromóforos.

Já é bem conhecido que o processo de fotodegradação dos corticóides ocorre através da perda da cadeia lateral localizada no C(17) (ALBINI; FASANI, 1998) ou o rearranjo das dienonas conjugadas localizadas no anel A (OGATA et al., 1998; SHIRASAKI et al., 2004).

O DRIFT mostrou a presença das bandas de absorção em 1749 e 1730 cm^{-1} , referente aos grupos carbonila 20 e 22-CO respectivamente, demonstrando que não houve degradação da cadeia lateral.

Nos resultados obtidos a partir do cromatograma (TIC) monitorado por HPLC/MS, observou-se um pico referente ao DFZ e outro pico, em 21 minutos, que apresenta massa igual a do DFZ e não apresenta absorção em 244 nm. Este resultado mostra que não houve quebra da molécula ou perda de átomos devido à exposição à luz. Isto sugere que pode ter ocorrido somente um rearranjo do anel A, conforme dados descritos na literatura para outros 11- β -hidroxi esteróides. A fotólise de 11- β -hidroxi esteróides leva a um rearranjo do anel A, com formação de produtos intermediários e de 1,11-epóxi esteroide (WILLIAMS et al., 1980). Estudos de RMN ^1H foram conduzidos com o objetivo de confirmar esta hipótese, no entanto, os espectros do R4 não irradiado e do R4 irradiado não apresentaram diferenças nos deslocamentos, havendo uma sobreposição dos espectros. Isto sugere que o esqueleto esteroidal não foi afetado. Como o DFZ possui oito centros quirais, pode-se sugerir que estaria ocorrendo isomerização ou epimerização em um desses centros quirais. No entanto, outros estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

O empacotamento molecular tem um papel importante na fotoestabilidade de fármacos no estado sólido e isto tem sido correlacionado com a possibilidade da penetração de oxigênio na estrutura cristalina (ALBINI; FASANI, 1998). Os estudos por DRX mostraram que as amostras apresentaram a mesma estrutura cristalina, demonstrando que as condições de estresse a que foram submetidas não levou à formação de polimorfos. Esta estabilidade provavelmente se deve ao rígido empacotamento molecular do DFZ (CUFFINI et al., 2007), no entanto isto não foi suficiente para proteger o fármaco da ação da luz. Apesar de RM1, RM2 e R4 possuírem a mesma forma polimórfica, apresentaram diferentes percentagens de degradação durante o estudo de fotoestabilidade. Esta diferença está relacionada a outros fatores, tais como morfologia, tamanho de partícula e área superficial. RM1 apresentou a maior área superficial e o menor tamanho de partícula (PAULINO et al., 2013), no entanto apresentou o menor percentual de degradação. Isto pode ser explicado devido ao grande número de aglomerados presentes na amostra micronizada. R4 apresentou o maior percentual de degradação, apesar de ter o maior tamanho de partícula. O maior tamanho de partícula e a menor área superficial de RM2 e R4 não foram suficientes para manter a estabilidade destes quando comparados com RM1. Neste caso, provavelmente o hábito cristalino e a cristalinidade contribuíram diretamente neste processo de degradação. Apesar das vantagens na velocidade de dissolução e efeito anti-inflamatório R4 apresentou uma menor estabilidade frente à luz UV em 254 nm.

De acordo com ICH (2006) produtos de degradação podem ser classificados como impurezas, e devem ser qualificados, quando presentes em níveis acima do limiar de qualificação. Qualificação é o processo de aquisição e avaliação de dados que estabelece a segurança biológica de uma impureza individual ou de um determinado perfil de impurezas (ICH, 2006). Estudos *in vitro* foram realizados para avaliar a possível toxicidade celular e o efeito anti-inflamatório do R4 e da amostra irradiada. Os resultados demonstraram que não houve redução da viabilidade celular, no entanto para o fármaco irradiado houve uma redução significativa na concentração de 300 µg/mL. Estes resultados sugerem que a irradiação altera a estrutura molecular de R4 e aumenta a citotoxicidade do composto.

Os resultados *in vitro* demonstram que R4 inibe a expressão do gene da cicloxigenase-2 (COX-2) e da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) expressos em linhagem de células de macrófagos murinos (RAW 264,7) por ativação com lipopolissacarídeo bacteriano de *E. coli*

(LPS). Esse fenômeno está de acordo com a atividade descrita para os glicocorticóides (NEWTON et al., 1998). Entretanto, a irradiação de R4, reduziu a capacidade de inibição da expressão de COX-2 e iNOS em RAW 264.7 estimulada por LPS, sugerindo que a luz altera a estrutura molecular e modifica o grupo farmacofórico do DFZ.

Os glicocorticóides interagem com dois fatores de transcrição distintos no processo inflamatório. Esses fatores, fator de transcrição nuclear NF kappa B (NFκB) e AP-1 interagem com o complexo receptor dos glicocorticóides (GR) e essa interação entre o grupo farmacofórico glicocorticóide e os respectivos fatores de transcrição reduzem a capacidade de transcrição dos mRNA para ambas as enzimas COX-2 e iNOS (NEWTON et al., 1998).

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a irradiação pode produzir alterações na estrutura molecular do DFZ e reduzir o seu efeito farmacológico. No entanto, a estrutura do esqueleto esteroidal parece não ter sido afetada. Como o DFZ apresenta 8 centros quirais, acredita-se que o fármaco esteja isomerizando ou epimerizando. Isto provavelmente está ocorrendo na hidroxila ligada ao C(11) e alterando os pontos de interação com o receptor de glicocorticóide.

Além de dar continuidade aos estudos de estabilidade no estado sólido, outras perspectivas surgiram para aprofundar as pesquisas com relação aos cristais ocultos de DFZ, tais como avaliar a biodisponibilidade destes cristais e suas propriedades mecânicas em formas farmacêuticas sólidas; aplicar o método do antissolvente para obtenção de cristais ocultos para outros fármacos de classe II e avaliar o desempenho de dissolução e ensaios *in vivo* para estes fármacos, além de entender o mecanismo geral de crescimento dos cristais ocultos de APIs.

CONCLUSÕES

- O método de cristalização por antissolvente possibilitou a obtenção de cristais ocos a partir de fármacos anidros e de baixa solubilidade.
- Os cristais ocos de DFZ apresentaram a mesma estrutura cristalina que a matéria-prima inicial; enquanto que para a CBZ houve uma transformação polimórfica da forma III (matéria-prima) para a forma I (cristal oco).
- Os cristais ocos de DFZ e de CBZ produziram um aumento significativo do perfil e eficiência de dissolução quando comparados a outras formas cristalinas dos fármacos.
- O polimorfo I da CBZ apresentou uma menor solubilidade que o polimorfo III; no entanto os cristais ocos do polimorfo I apresentaram uma maior dissolução, sendo demonstrada a relevância do desenho e controle da morfologia de APIs e não apenas do polimorfismo.
- A velocidade de dissolução de fármacos pouco solúveis não é necessariamente aumentada através do processo de micronização, e este processo deve ser estudado e controlado devido ao impacto que pode ter na dissolução e, consequentemente, na biodisponibilidade.
- A menor VDI da matéria-prima micronizada do DFZ pode ser associada a problemas de molhabilidade, e pode ser melhorada com adição de surfactante.
- O tamanho de partícula interfere no perfil de dissolução; no entanto isto é dependente do hábito cristalino e da área superficial.
- O principal mecanismo de crescimento do cristal oco é em espiral, e o efeito Berg tem uma ação pronunciada sobre a cinética da superfície e hábito do cristal de DFZ.
- Os cristais ocos de DFZ são formados entre o final do efeito Berg e o início do mecanismo de difusão limitada.
- Fatores como a quantidade de antissolvente e evaporação de solvente, força impulsora e velocidade de crescimento são responsáveis pela obtenção do hábito cristalino oco. Mudanças nesses parâmetros levam ao crescimento sólido.
- Estudos *in vivo* mostraram que o hábito cristalino interfere no efeito farmacológico e que os cristais ocos (R4) apresentaram um maior efeito anti-inflamatório quando comparado ao hábito micronizado (RM1) e não micronizado (RM2).
- RM1, RM2 e R4 foram estáveis à condições de 40 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ UR por 6 meses e apresentaram sensibilidade à luz quando

irradiados sob luz UV 254 nm (1,2 milhões de Lux/hora), sendo que R4 apresentou a maior fotodegradação, mostrando que o hábito cristalino interfere na estabilidade.

- R4 irradiado apresentou diminuição do ponto de fusão, diminuição da banda de máxima absorção no UV e da banda correspondente ao grupamento OH no infravermelho. Em relação ao fármaco não irradiado, não houve alteração da massa e os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênios foram sobreponíveis, indicando que não houve alteração no esqueleto esteroidal. Como o DFZ possui 8 centros quirais, sugere-se uma possível isomerização ou epimerização em um destes centros quirais.

- O DFZ não irradiado promoveu maior diminuição da inflamação em modelo de célula RAW 264,7 quando comparado à amostra R4 irradiada, sendo que R4 também apresentou maior citotoxicidade.

- A influência do R4 irradiado sobre a capacidade de inibição da expressão dos genes da COX-2 e iNOS em linhagem de células de macrófagos murinos, RAW 264,7, *in vitro*, demonstrou que o fármaco irradiado perdeu a capacidade de inibir a expressão dos genes avaliados, indicando redução de seu efeito anti-inflamatório, sugerindo uma possível mudança isomérica ou alteração conformacional que impede a ligação nos receptores de glicocorticoides.

- Os cristais ocus de DFZ permitiram um aumento na velocidade de dissolução e uma melhor atividade anti-inflamatória quando comparado as outras formas cristalinas do fármaco, mas apresentaram uma menor estabilidade à luz, devendo ser protegido deste fator durante armazenamento e uso.

REFERÊNCIAS

AALTONEN, J.; ALLESØ, M.; MIRZA, S.; KORADIA, V.; GORDON, K.C.; RANTANEN, J. Solid form screening--a review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 1, p. 23–37, jan 2009.

ABBONA, F.; AQUILANO, D. Morphology of Crystal Grown from Solutions. In: DHANARAJ, G.; BYRAPPA, K.; PRASAD, V.; DUDLEY, M. (Eds.). **Springer Handbook of Crystal Growth**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 53–92.

ABDOU, H. M.; HANNA, S.; MUHAMMAD, N. Dissolução. In: KOOGAN, G. (Ed.). **Remington A Ciência e a Prática da Farmácia**. 20. ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 2000. p. 674.

AGRAWAL, S.; ASHOKRAJ, Y.; BHARATAM, P. V; PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Solid-state characterization of rifampicin samples and its biopharmaceutic relevance. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 2-3, p. 127–44, jun 2004.

ALBINI, A.; FASANI, E. Photochemistry of Drugs : An Overview and Practical Problems. In: ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY (Ed.). **Drugs: Photochemistry and Photostability**. Italy: [s.n.], 1998. p. 1–73.

ALSENZ, J.; KANSY, M. High throughput solubility measurement in drug discovery and development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 546–67, 30 jul 2007.

AMIDON, G. L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413–20, mar 1995.

ATTWOOD, D.; FLORENCE, A. T.; ROTHSCILD, Z. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. 3. ed. São Paulo: [s.n.], 2003. p. 736

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. Segunda ed. Porto Alegre: [s.n.], 2008. p. 677

AYRES, C. BURKE, W. DICKINSON, P. KIRK, G. PUGH, R. SHARMA-SINGH, G. KITTLETY, R. Intrinsic Dissolution Rate Determinations in Early Development and Relevance to In Vivo Performance. **American Pharmaceutical Review**, v. 10, n. 2, p. 74–79, 2007.

AZARMI, S.; ROA, W.; LÖBENBERG, R. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, n. 1, p. 12–21, 2 jan 2007.

BALL, R. C.; BLUNT, M. J.; SPIVACK, O. R. Diffusion-controlled growth. **Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences**, v. 423, p. 123–132, 1989.

BARNES, P. J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. **Clinical Science**, v. 94, n. 6, p. 557–72, jun 1998.

BARRETT, M.; MCNAMARA, M.; HAO, H.; BARRETT, P.; GLENNON, B. Supersaturation tracking for the development, optimization and control of crystallization processes. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 88, n. 8, p. 1108–1119, ago 2010.

BERG, W. F. Crystal Growth from Solutions. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 164, p. 79–95, 1938.

BLAGDEN, N.; MATAS, M. DE; GAVAN, P. T.; YORK, P. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 617–30, 30 jul 2007.

BOGOYAVLENSKIY, V.; CHERNOVA, N. Diffusion-limited aggregation: A relationship between surface thermodynamics and crystal morphology. **Physical review E**, v. 61, n. 2, p. 1629–33, fev 2000.

BORCHERT, C.; SUNDMACHER, K. Crystal Aggregation in a Flow Tube: Image-Based Observation. **Chemical Engineering & Technology**, v. 34, n. 4, p. 545–556, 24 abr 2011.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília: [s.n.], 2010. p. 524

BRASIL. RESOLUÇÃO - RDC Nº 45 , DE 9 DE AGOSTO DE 2012. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária** - ANVISA, Brasília. p. 1–8. Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0045_09_08_2012.html. Acesso em: 24 jan. 2010.

BRITTAİN, H. G. X-ray Diffraction III: Pharmaceutical Applications. **Spectroscopy**, v. 16, n. July, p. 14, 2001.

BRITTAİN, H. G. **Polymorphism in Pharmaceutical Solids**. 2. ed. USA: [s.n.], 2009. p. 640

BUGAY, D. E. Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 43–65, 16 maio 2001.

BYRN, S. R.; PFEIFFER, R. R.; TOWELL, J. G. **Solid-State Chemistry of Drugs**. Sec ond ed. USA: [s.n.], 1999. p. 573

CAFFIERI, S.; DALL'ACQUA, S.; CASTAGLIUOLO, I.; BRUN, P.; MIOLO, G. UVB photolysis of hydrocortisone 21-acetate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 4-5, p. 771–7, 5 ago 2008.

CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Médica**, v. 70, n. 2, p. 93–103, fev 2004.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway,

nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). **Planta Médica**, v. 69, n. 11, p. 973–83, nov 2003.

CALIXTO, J. B.; ZANINI, J. C.; CRUZ, A. B.; YUNES, R. A.; MEDEIROS, Y. S. Extract and compounds obtained from mandevilla velutina inhibit arachidonic acid-induced ear oedema in mice, but not rat stomach contraction. **Prostaglandins**, v. 41, n. 5, p. 515–526, maio 1991.

CARRAWAY, M.S.; WELTY-WOLF, K.E.; MILLER, D.L.; ORTEL, T.L.; IDELL, S.; GHIO, A.J.; PETERSEN, L.C.; PIANTADOSI, C.A. Blockade of tissue factor: treatment for organ injury in established sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 167, n. 9, p. 1200–9, 1 maio 2003.

CHAMARTHY, S. P.; PINAL, R. The nature of crystal disorder in milled pharmaceutical materials. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 331, n. 1-2, p. 68–75, dez 2008.

CHAUHAN, B.; SHIMPI, S.; PARADKAR, A. Preparation and characterization of etoricoxib solid dispersions using lipid carriers by spray drying technique. **AAPS PharmSciTech**, v. 6, n. 3, p. E405–12, jan 2005.

CHAUMEIL, J. C. Micronization: a method of improving the bioavailability of poorly soluble drugs. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 20, n. 3, p. 211–5, abr 1998.

CHEN, J.; SARMA, B.; EVANS, J. M. B.; MYERSON, A. S. Pharmaceutical Crystallization Published as part of the Crystal Growth & Design 10th Anniversary Perspective. **Crystal Growth & Design**, v. 11, p. 887–895, 2011.

CHERNOV, A. A. Stability of faceted shapes. **Journal of Crystal Growth**, v. 24-25, p. 11–31, out 1974.

CHIENG, N.; RADES, T.; AALTONEN, J. An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 4, p. 618–44, 25 jun 2011.

CHIKHALIA, V.; FORBES, R. T.; STOREY, R. A; TICEHURST, M. The effect of crystal morphology and mill type on milling induced crystal disorder. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 1, p. 19–26, jan 2006.

CHO, E.; CHO, W.; CHA, K.-H.; PARK, J.; KIM, M.-S.; KIM, J.-S.; PARK, H.J.; HWANG, S.-J. Enhanced dissolution of megestrol acetate microcrystals prepared by antisolvent precipitation process using hydrophilic additives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 396, n. 1-2, p. 91–8, 30 ago 2010.

COHEN, J.; HENRY, R. A.; SKOLNIK, S. Hollow Crystals of Nitroguanidin. **Vacuum Differential Thermal Analysis**. **Science**, v. 111, p. 278–279, 1950.

COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123–33, maio 2001.

CUBILLAS, P.; ANDERSON, M. W. **Zeolites and Catalysis: Synthesis, Reactions and Applications**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010. p. 881

CUFFINI, S.L.; ELLENA, J.F.; MASCARENHAS, Y.P.; AYALA, A.P.; SIELSER, H.W.; FILHO, J.M.; MONTI, G. A.; AIASSA, V.; SPERANDEO, N.R. Physicochemical characterization of deflazacort: thermal analysis, crystallographic and spectroscopic study. **Steroids**, v. 72, n. 3, p. 261–9, mar 2007.

CUFFINI, S. L.; PITALUGA, A. J.; TOMBARI, D. Polimorfismo em Farmacos. In: KOOGAN, G. (Ed.). **Ciências Farmacêuticas Biofarmacotécnica**. 1. ed. Rio Janeiro: [s.n.], 2009. p. 321.

DAVEY, R. J.; GARSIDE, J. **From molecules to Crystallizers**. Second ed. USA: [s.n.], 2002. p. 79

DETTE, S. S.; STELZER, T.; JONES, M. J.; COQUEREL, G.; ULRICH, J. Fascinating control of crystalline microstructures. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 88, n. 9, p. 1158–1162, set 2010.

DETTE, S. S.; STELZER, T.; JONES, M. J.; ULRICH, J. Dehydration behaviour of hydrates. **Crystal Research and Technology**, v. 45, n. 7, p. 697–702, 23 abr 2010.

DETTE, S. S.; STELZER, T.; RO, E.; JONES, M. J.; ULRICH, J. Controlling the Internal Diameter of Nanotubes by Changing the Concentration of the Antisolvent 2007. **Crystal Growth & Design**, v. 7, p. 7–9, 2007.

DOKOUMETZIDIS, A.; MACHERAS, P. A century of dissolution research: from Noyes and Whitney to the biopharmaceutics classification system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 321, n. 1-2, p. 1–11, 14 set 2006.

DONG, Y.; NG, W. K.; SHEN, S.; KIM, S.; TAN, R. B. H. Preparation and characterization of spironolactone nanoparticles by antisolvent precipitation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 375, n. 1-2, p. 84–8, 22 jun 2009.

DONG, Y.-D.; BOYD, B. J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 417, n. 1-2, p. 101–11, 30 set 2011.

EDDLESTON, M. D.; JONES, W. Formation of Tubular Crystals of Pharmaceutical Compounds. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 1, p. 365–370, 6 jan 2010.

FAHR, A.; LIU, X. Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 4, n. 4, p. 403–16, jul 2007.

FAURE, F.; TROLLIARD, G.; NICOLLET, C.; MONTEL, J.-M. A developmental model of olivine morphology as a function of the cooling rate and the degree of undercooling. **Contributions to Mineralogy and Petrology**, v. 145, n. 2, p. 251–263, 26 mar 2003.

FLICKER, F.; EBERLE, V. A.; BETZ, G. Variability in commercial carbamazepine samples--impact on drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 410, n. 1-2, p. 99–106, 30 maio 2011.

FORD, J. L.; MANN, T. E. Fast-Scan DSC and its role in pharmaceutical physical form characterisation and selection ☆ **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 5, p. 422–430, 2012.

FORD, J. L.; TIMMINS, P. **Pharmaceutical Thermal Analysis Techniques and Applications**. [S.l: s.n.], 1989. p. 313

GAISFORD, S.; DENNISON, M.; TAWFIK, M.; JONES, M. D. Following mechanical activation of salbutamol sulphate during ball-milling with isothermal calorimetry. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 393, n. 1-2, p. 74–8, jun 2010.

GALICHET, L. Y. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**. Acesso em: ed. Published by the Pharmaceutical Press, 2006, on line. Disponível em <http://www.medicinescomplete.com/mc/clarke's/current>.: [s.n.], 2006.

GARCIA, E.; BOISTELLE, R.; HOFF, C. Crystallization and dissolution of pharmaceutical compounds An experimental approach. **Journal of Crystal Growth**, v. 199, p. 1360–1364, 1999.

GAREKANI, H. A.; SADEGHI, F.; BADIEE, A.; MOSTAFA, S. A.; RAJABI-SIAHBOOMI, A R. Crystal habit modifications of ibuprofen and their physicommechanical characteristics. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 27, n. 8, p. 803–9, set 2001.

GENNARO, A. R. **Remington A Ciência e a Prática da Farmácia**. 20. ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 2004. p. 2208

GILCHRIST, S. E.; LETCHFORD, K.; BURT, H. M. The solid-state characterization of fusidic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 422, n. 1-2, p. 245–53, 17 jan 2012.

GREER, H.; WHEATLEY, P. S.; ASHBROOK, S. E.; MORRIS, R. E. Early Stage Reversed Crystal Growth of Zeolite A and Its Phase Transformation to Sodalite. **Journal of the American Chemical Society**, n. 13, p. 17986–17992, 2009.

GRZESIAK, A. L.; LANG, M.; KIM, K.; MATZGER, A. J. Comparison of the four anhydrous polymorphs of carbamazepine and the crystal structure of form I. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 11, p. 2260–71, nov 2003.

HAN, X.; GHOROI, C.; TO, D.; CHEN, Y.; DAVÉ, R. Simultaneous micronization and surface modification for improvement of flow and dissolution of drug particles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 415, n. 1-2, p. 185–95, 30 ago 2011.

HATKAR, U. N.; GOGATE, P. R. Process intensification of anti-solvent crystallization of salicylic acid using ultrasonic irradiations. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 57-58, p. 16–24, jul 2012.

HENG, J. Y. Y.; THIELMANN, F.; WILLIAMS, D. R. The effects of milling on the surface properties of form I paracetamol crystals. **Pharmaceutical research**, v. 23, n. 8, p. 1918–27, ago 2006.

HENG, J. Y. Y.; WILLIAMS, D. R. Wettability of paracetamol polymorphic forms I and II. **Langmuir : the ACS Journal of Surfaces and Colloids**, v. 22, n. 16, p. 6905–9, 1 ago 2006.

HINTZ, R.; JOHNSON, K. The effect of particle size distribution on dissolution rate and oral absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 51, n. 1, p. 9–17, 1 abr 1989.

HUANG, L.-F.; TONG, W.-Q. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 321–34, 23 fev 2004.

ICH. **Stability testing: photostability testing of new drug substances and products Q1B**. [S.l: s.n.], 1996. Disponível em:
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B_Guideline.pdf

ICH. **Specifications: Test Procedures and Acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances Q6A**. [S.l: s.n.], 1999. Disponível em:
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q6A/Step4/Q6Astep4.pdf

ICH. **Impurities in New Drug Products Q3B(R2)**, [S.l: s.n.], 2006. Disponível em:
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2_Guideline.pdf

ISSA, M. G.; FERRAZ, H. G. Intrinsic Dissolution as a Tool for Evaluating Drug Solubility in Accordance with the Biopharmaceutics Classification System. **Pharmaceutical Sciences**, p. 6–13, Aug 2011.

JOSHI, N.; RAJESHWARI, K. Deflazacort. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 55, n. 4, p. 296–300, 2009.

KARWAR, P.; GRAESER, K.; GORDON, K. C.; STRACHAN, C. J.; RADES, T. Effect of different preparation methods on the dissolution behaviour of amorphous indomethacin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** :, v. 80, n. 2, p. 459–64, fev 2012.

KAWABATA, Y.; WADA, K.; NAKATANI, M.; YAMADA, S.; ONOUE, S. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 1–10, 25 nov 2011.

KENDALL, K.; STANTON, C. Adhesion and aggregation of fine particles. **Powder Technology**, v. 121, n. 2-3, p. 223–229, nov 2001.

KESISOGLOU, F.; PANMAI, S.; WU, Y. Nanosizing--oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 631–44, jul 2007.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, n. 3, p. 229–45, nov 2004.

KOBAYASHI, Y.; ITO, S.; ITAI, S.; YAMAMOTO, K. Physicochemical properties and bioavailability of carbamazepine polymorphs and dihydrate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 193, p. 137–146, 2000.

KURODA, T.; IRISAWA, T.; OOKAWA, A. GROWTH OF A POLYHEDRAL CRYSTAL FROM SOLUTION AND ITS MORPHOLOGICAL STABILITY. **Journal of Crystal Growth**, v. 42, p. 41–46, 1977.

LANZA, L.; SCUDELETTI, M.; MONACO, E.; MONETTI, M.; PUPPO, F.; FILACI, G.; INDIVERI, F. Possible differences in the mechanism(s) of action of different glucocorticoid hormone compounds. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 876, p. 193–7, 22 jun 1999.

LASKIN, D. L.; PENDINO, K. J. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 35, p. 655–77, jan 1995.

LAX, E. R.; MILITZER, K.; TRAUSCHEL, A. A simple method for oral administration of drugs in solid form to fully conscious rats. **Laboratory Animals**, v. 17, n. 1, p. 50–4, jan 1983.

LEE, S.H.; SOYOOLA, E.; CHANMUGAM, P.; HART, S.; SUN, W.; ZHONG, H.; LIOU, S.; SIMMONS, D.; HWANG, D. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 36, p. 25934–8, 25 dez 1992.

LI, H.; KIANG, Y.-H.; JONA, J. Multiple approaches to pharmaceutical polymorphism investigation--a case study. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 5, p. 426–32, 8 dez 2009.

LIEW, F. Y. The role of innate cytokines in inflammatory response. **Immunology Letters**, v. 85, n. 2, p. 131–4, 22 jan 2003.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez 2001.

LÖWENBERG, M.; VERHAAR, A. P.; BRINK, G. R. VAN DEN; HOMMES, D. W. Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. **Trends in Molecular Medicine**, v. 13, n. 4, p. 158–63, abr 2007.

MALLET, F.; PETIT, S.; LAFONT, S.; BILLOT, P.; LEMARCHAND, D.; COQUEREL, G. Crystal Growth Mechanism in a Solution of Hollow Whiskers of Molecular Compounds. **Crystal Growth & Design**, v. 4, n. 5, p. 965–969, 2004.

MANISH, M.; HARSHAL, J.; ANANT, P. Melt sonocrystallization of ibuprofen: effect on crystal properties. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, n. 1, p. 41–8, maio 2005.

MARTINS, D.; STELZER, T.; ULRICH, J. Formation of Crystalline Hollow Whiskers as Relics of Organic Dissipative Structures b b. **Crystal Growth & Design**, v. 11, p. 3020–3026, 2011.

MIOLO, G.; GALLOCCHIO, F.; LEVORATO, L.; DALZOPPO, D.; BEYERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, G.M.J.; CAFFIERI, S. UVB photolysis of betamethasone and its esters: characterization of photoproducts in solution, in pig skin and in drug formulations. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 96, n. 1, p. 75–81, 17 jul 2009.

MODI, S.R.; DANTULURI, A.K.R.; PURI, V.; PAWAR, Y.B.; NANDEKAR, P.; SANGAMWAR, A.T.; PERUMALLA, S.R.; SUN,

C.C.; BANSAL, A.K. Impact of Crystal Habit on Biopharmaceutical Performance of Celecoxib. **Crystal Growth & Design**, v. 13, n. 7, p. 2824–2832, 3 jul 2013.

MOREIRA, M. L.; ANDRÉS, J.; MASTELARO, V. R.; VARELA, J. A.; LONGO, E. On the reversed crystal growth of BaZrO₃ decaoctahedron: shape evolution and mechanism. **CrystEngComm**, v. 13, n. 19, p. 5818, 2011.

NANEV, C. N. Polyhedral (in-) stability by increasing supersaturation–maximum rate of stable growth. **Journal of Crystal Growth**, v. 212, n. 3-4, p. 516–521, maio 2000.

NEWTON, R. Anti-inflammatory glucocorticoids: Changing concepts. **European Journal of Pharmacology**, p. 1–6, 6 jun 2013.

NEWTON, R.; SEYBOLD, J.; KUITERT, L. M.; BERGMANN, M.; BARNES, P. J. Repression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E₂ release by dexamethasone occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms involving loss of polyadenylated mRNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 48, p. 32312–21, 27 nov 1998.

NGUYEN, T.; BRUNSON, D.; CRESPI, C.L.; PENMAN, B.W.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 7, p. 3030–4, 1 abr 1992.

NIWA, K.; IKEGAYA, H.; HASEGAWA, M.; OHSUNA, T.; YAGI, T. Submicron rectangular hollow tube crystals of rutile-type GeO₂. **Journal of Crystal Growth**, v. 312, n. 10, p. 1731–1735, maio 2010.

OAKI, Y.; IMAI, H. Experimental Demonstration for the Morphological Evolution of Crystals Grown in Gel Media. **Crystal Growth & Design**, v. 3, n. 5, p. 711–716, set 2003.

OGATA, M.; NORO, Y.; YAMADA, M.; TAHARA, T.; NISHIMURA, T. Photodegradation Products of Methylprednisolone Suleptanate in

Intermediate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 1, p. 91–95, 1998.

OPPONG, E.; FLINK, N.; CATO, A. C. B. Molecular mechanisms of glucocorticoid action in mast cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 22 maio 2013.

PADILHA, A. F.; FILHO, F. A. **Técnicas de Análise Micro Estrutural**. 1. ed. Brasil: [s.n.], 2004. p. 190

PAN, X.; AI, F.; JIN, W.; LIU, Y.; ZHANG, Y. Morphologies of solid-liquid interface and surface steps during rapid growth of BaB₂O₄ single crystals. **Science in China Series G: Physics, Mechanics and Astronomy**, v. 50, n. 4, p. 539–545, ago 2007.

PASQUALI, I.; BETTINI, R.; GIORDANO, F. Solid-state chemistry and particle engineering with supercritical fluids in pharmaceuticals. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 4, p. 299–310, mar 2006.

PATIL, S. K.; WAGH, K. S.; PARIK, V. B.; AKARTE, A. M.; BAVISKAR, D. T. Strategies for solubility enhancement of poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 8, n. 2, p. 74–80, 2011.

PAULINO, A.S.; RAUBER, G.; CAMPOS, C.E.M.; MAURÍCIO, M.H.P.; DE AVILLEZ, R.R.; CAPOBIANCO, G.; CARDOSO, S.G.; CUFFINI, S.L. Dissolution enhancement of Deflazacort using hollow crystals prepared by antisolvent crystallization process. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 2, p. 294–301, 13 maio 2013.

PAULINO, A.S.; RAUBER, G.; DEOBALD, A.M.; PAULINO, N.; SAWAYA, A.C.H.F.; EBERLIN, M.N.; CARDOSO, S.G. Isolation and characterization of a degradation product of deflazacort. **Pharmazie**, v. 67, p. 495–499, 2012.

PAULINO, A.S.; RAUBER, G.S.; CAMPOS, C.E.M.; MAURÍCIO, M.H.P.; DE AVILLEZ, R.R.; CUFFINI, S.L.; CARDOSO, S.G. Hollow

crystal anti-solvent preparation process as a promising technique to improve dissolution of poorly soluble drugs. **Journal of Crystal Growth**, v. 366, p. 76–81, mar 2013.

PERKINS, M.C.; BUNKER, M.; JAMES, J.; RIGBY-SINGLETON, S.; LEDRU, J.; MADDEN-SMITH, C.; LUK, S.; PATEL, N.; ROBERTS, C.J. Towards the understanding and prediction of material changes during micronisation using atomic force microscopy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 1, p. 1–8, ago 2009.

PERRY, A. R.; PERUFFO, M.; UNWIN, P. R. Quantitative Plane-Resolved Crystal Growth and Dissolution Kinetics by Coupling *In situ* Optical Microscopy and Diffusion Models: The Case of Salicylic Acid in Aqueous Solution. **Crystal Growth & Design**, v. 13, n. 2, p. 614–622, 6 fev 2013.

POODT, P.W.G.; HEIJNA, M.C.R.; SCHOUTEN, A.; GROS, P.; VAN ENCKEVORT, W.J.P.; VLIEG, E. Simple Geometry for Diffusion Limited Protein Crystal Growth: Harnessing Gravity to Suppress Convection. **Crystal Growth & Design**, v. 9, n. 2, p. 885–888, 4 fev 2009.

RASCHKE, W. C.; BAIRD, S.; RALPH, P.; NAKOINZ, I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. **Cell**, v. 15, n. 1, p. 261–7, set 1978.

RAVAL, M.; BABU, S.; THIMMASETTY, J.; PARIKH, R.; SHETH, N.; SUBRAHMANYAM, C. Influence of solvents on the crystal habit and properties of rofecoxib and celecoxib: No evidence of polymorphism. **Journal of Pharmaceutical Negative Results**, v. 1, n. 2, p. 40, 2010.

RUSTICHELLI, C.; GAMBERINI, G.; FERIOLI, V.; GAMBERINI, M.C.; FICARRA, R.; TOMMASINI, S. Solid-state study of polymorphic drugs: carbamazepine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, n. 1, p. 41–54, ago 2000.

SAITO, Y.; UETA, T. Monte Carlo studies of equilibrium and growth shapes of a crystal. **Physical Review A**, v. 40, n. 6, p. 3408–3419, 1989.

SANDER, J. R. G.; BUČAR, D.-K.; BALTRUSAITIS, J.; MACGILLIVRAY, L. R. Organic nanocrystals of the resorcinarene hexamer via sonochemistry: evidence of reversed crystal growth involving hollow morphologies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 16, p. 6900–3, 25 abr 2012.

SAVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug solubility: importance and enhancement techniques. **ISRN Pharmaceutics**, v. 2012, p. 1–10, jan 2012.

SAZAKI, G.; VAN DRIESCHE, A.E.S.; DAI, G.; OKADA, M.; MATSUI, T.; OTÁLORA, F.; TSUKAMOTO, K.; NAKAJIMA, K. *In situ* observation of elementary growth processes of protein crystals by advanced optical microscopy. **Protein and Peptide Letters**, v. 19, n. 7, p. 743–60, jul 2012.

SAZAKI, G.; TSUKAMOTO, K.; YAI, S.; OKADA, M.; NAKAJIMA, K. In Situ Observation of Dislocations in Protein Crystals during Growth by Advanced Optical Microscopy. **Crystal Growth & Design**, v. 5, n. 5, p. 1729–1735, set 2005.

SCHUSTER, A.; STELZER, T.; ULRICH, J. Generation of Crystalline Hollow Needles: New Approach by Liquid-Liquid Phase Transformation. **Chemical Engineering & Technology**, v. 34, n. 4, p. 599–603, 2 abr 2011.

SCHUSTER, A.; STELZER, T.; PETERSEN, S.; ULRICH, J. Closed Crystalline Tubes as a Container System. **Chemical Engineering & Technology**, n. 5, p. 787–790, 2010.

SCREMIN, A.; PIAZZON, M.; SILVA, M.A.S.; KUMINEK, G.; CORREA, G.M.; PAULINO, N.; CARDOSO, S.G. Spectrophotometric and HPLC determination of deflazacort in pharmaceutical dosage forms. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, p. 281–287, jun 2010.

SEHIĆ, S.; BETZ, G.; HADZIDEDIĆ, S.; EL-ARINI, S. K.; LEUENBERGER, H. Investigation of intrinsic dissolution behavior of

different carbamazepine samples. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 386, n. 1-2, p. 77–90, fev 2010.

SHAPIRA, L.; SOSKOLNE, W.A.; HOURI, Y.; BARAK, V.; HALABI, A.; STABHOLZ, A. Protection against endotoxic shock and lipopolysaccharide-induced local inflammation by tetracycline: correlation with inhibition of cytokine secretion. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 3, p. 825–8, mar 1996.

SHEKUNOV, B. Y.; YORK, P. Crystallization processes in pharmaceutical technology and drug delivery design. **Journal of Crystal Growth**, v. 211, p. 122–136, 2000.

SHIRASAKI, Y.; INADA, K.; INOUE, J.; NAKAMURA, M. Isolation and structure elucidation of the major photodegradation products of loteprednol etabonate. **Steroids**, v. 69, n. 1, p. 23–34, jan 2004.

SHUR, J.; PRICE, R. Advanced microscopy techniques to assess solid-state properties of inhalation medicines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 4, p. 369–82, 30 mar 2012.

SKOOG, D. A.; HOLLER, J. F.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. São Paulo: [s.n.], 2002. p. 836

SMITH, W. L.; MARNETT, L. J.; DEWITT, D. L. Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 49, n. 3, p. 153–79, jan 1991.

SPERANDEO, N. R. Development and Validation of a Dissolution Test for 6 mg Deflazacort Tablets. **Scientia Pharmaceutica**, v. 77, n. 3, p. 679–693, 2009.

SPLETTSTOESSER, W. D.; SCHUFF-WERNER, P. Oxidative stress in phagocytes--“the enemy within”. **Microscopy Research and Technique**, v. 57, n. 6, p. 441–55, 15 jun 2002.

STEPHENSON, G. A.; FORBES, R. A.; REUTZEL-EDENS, S. M. Characterization of the solid state: quantitative issues. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 67–90, 16 maio 2001.

SUNAGAWA, I. Growth and Morphology of Crystals. **Forma**, v. 1993, n. 358, p. 147–166, 1999.

SUNAGAWA, I. **Crystals Growth, Morphology and Perfection**. 1. ed. New York: Cambridge University Press, 2005. p. 295

SUNAGAWA, I. Single Crystal Grown Under Unconstrained Conditions. **Springer Handbook of Crystal Growth**. 1. ed. New York: [s.n.], 2010. p. 133–157.

SWEETMAN, S. **MARTINDALE: The Complete Drug Reference**. Pharmaceutical Press, 2007, on line
<<http://www.medicinescomplete.com/mc/martindale/current>>. Acesso em 10.03.2007.: [s.n.], 2007.

TENG, X. W.; CUTLER, D. C.; DAVIES, N. M. Degradation kinetics of mometasone furoate in aqueous systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 259, n. 1-2, p. 129–41, 18 jun 2003.

THOMAS, V.H.; BHATTACHAR, S.; HITCHINGHAM, L.; ZOCHARSKI, P.; NAATH, M.; SURENDRAN, N.; STONER, C.L.; EL-KATTAN, A. The road map to oral bioavailability: an industrial perspective. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 2, n. 4, p. 591–608, ago 2006.

THORAT, A. A.; DALVI, S. V. Liquid antisolvent precipitation and stabilization of nanoparticles of poorly water soluble drugs in aqueous suspensions: Recent developments and future perspective. **Chemical Engineering Journal**, v. 181-182, p. 1–34, fev 2012.

TICEHURST, M.D.; BASFORD, P. A; DALLMAN, C.I.; LUKAS, T.M.; MARSHALL, P. V; NICHOLS, G.; SMITH, D. Characterisation of the influence of micronisation on the crystallinity and physical stability of revatropate hydrobromide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 193, n. 2, p. 247–59, jan 2000.

TILG, H.; WILMER, A.; VOGEL, W.; HEROLD, M.; NÖLCHEN, B.; JUDMAIER, G.; HUBER, C. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. **Gastroenterology**, v. 103, n. 1, p. 264–74, jul 1992.

TØNNESSEN, H. H. **Phostability of Drugs and Drug Formultions**. 2. ed. New York: [s.n.], 2004. p. 412

TORRADO, G. Process-induced crystallite size and dissolution changes elucidated by a variety of analytical methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 166, n. 1, p. 55–63, maio 1998.

TRIPHATI, K. D. **Farmacologia Médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 2006. p. 774

TSUTSUMI, S.; IIDA, M.; TADA, N.; *et al.* Characterization and evaluation of miconazole salts and cocrystals for improved physicochemical properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 421, n. 2, p. 230–6, 15 dez 2011.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. **The United States Pharmacopeia**. 30. ed. USA: [s.n.], 2007. p. 1350

VERNON-PARRY, K. D. Scanning Electron Microscopy : an introduction. **Analysis**, v. 13, n. 4, p. 40–44, 2000.

VIÇOSA, A.; LETOURNEAU, J.-J.; ESPITALIER, F.; INÊS RÉ, M. An innovative antisolvent precipitation process as a promising technique to prepare ultrafine rifampicin particles. **Journal of Crystal Growth**, v. 342, n. 1, p. 80–87, mar 2012.

WACHSMUTH, A.; STELZER, T.; ULRICH, J. Decreasing the Diameter of Crystalline Tubes and an Approach to Explain its Nucleation. **Chemical Engineering & Technology**, v. 34, n. 4, p. 578–582, 2 abr 2011.

WANG, H.; LI, Q.; REYES, S.; ZHANG, J.; XIE, L.; MELENDEZ, V.; HICKMAN, M.; KOZAR, M.P. Formulation and particle size reduction improve bioavailability of poorly water-soluble compounds with antimalarial activity. **Malaria Research and treatment**, v. 2013, p. 769234, jan 2013.

WANG, Z.; CHEN, J.-F.; LE, Y.; SHEN, Z.-G.; YUN, J. Preparation of Ultrafine Beclomethasone Dipropionate Drug Powder by Antisolvent

Precipitation. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, n. 14, p. 4839–4845, jul 2007.

WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. Princípios gerais no tratamento da inflamação. In: GUANABARA-KOOGAN (Ed.). **Farmacologia Clínica**. 3. ed. Brasil: [s.n.], 2004. p. 1096.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis – A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. UK: [s.n.], 1999. p. 337

WILLIAMS, A. C.; TIMMINS, P.; LU, M.; FORBES, R. T. Disorder and dissolution enhancement: deposition of ibuprofen on to insoluble polymers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 3-4, p. 288–94, nov 2005.

WILLIAMS, R.; MOORE, I. R. H.; LI, R.; WEEKSLC, C. M. Photochemistry of 1 la- and 110-Hydroxy Steroidal 1,4-Dien-3-ones and 1 laand 1 lp-Hydroxy Steroidal Bicyclo[3.1.0]hex-3-en-2-onesi n Neutral and Acidic Media. **American Chemical Society**, v. 45, n. 12, p. 2324–2331, 1980.

YANAGIYA, S.; GOTO, N. Hybrid observation of crystal growth using laser confocal microscope with atomic force microscope. **Journal of Crystal Growth**, v. 312, n. 22, p. 3356–3360, nov 2010.

YANG, X.; FU, J.; JIN, C.; CHEN, J.; LIANG, C.; WU, M.; ZHOU, W. Formation mechanism of CaTiO₃ hollow crystals with different microstructures. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 40, p. 14279–87, 13 out 2010.

YU, L. X.; CARLIN, A. S.; AMIDON, G. L.; HUSSAIN, A. S. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 270, n. 1-2, p. 221–227, fev 2004.

ZAKERI-MILANI, P.; BARZEGAR-JALALI, M.; AZIMI, M.; VALIZADEH, H. Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability.

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 73, n. 1, p. 102–6, set 2009.

ZHOU, W. Reversed Crystal Growth : Implications for Crystal Engineering. **Advanced Materials**, v. 22, p. 3086–3092, 2010.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109–110, jun 1983.